

Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno matematički fakultet

Odjel za biologiju

Martin Ripić

**ANTIMIKROBNI PEPTIDI U MORSKIM ŠKOLJKAŠIMA – IMUNOLOŠKI
ODGOVOR I BIOMEDICINSKI POTENCIJAL**

Završni rad

Split, 2018.

Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno matematički fakultet

Odjel za biologiju

Martin Ripić

**ANTIMIKROBNI PEPTIDI U MORSKIM ŠKOLJKAŠIMA – IMUNOLOŠKI
ODGOVOR I BIOMEDICINSKI POTENCIJAL**

Završni rad

Split, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

ANTIMIKROBNI PEPTIDI U MORSKIM ŠKOLJKAŠIMA – IMUNOLOŠKI ODGOVOR I BIOMEDICINSKI POTENCIJAL

Martin Ripić

SAŽETAK

U zadnjih nekoliko godina, patogene bakterije su razvile rezistenciju na većinu poznatih klasa antibiotika, uključujući pojavu višestruko rezistentnih „superbakterija“. Javila se potreba za razvojem novih terapeutika, a kao potencijalni kandidati nameću se antimikrobni peptidi (AMP) koji čine sastavni dio urođenog imunološkog sustava svih živućih vrsta na Zemlji. Velika strukturalna različitost i multimodalni mehanizam djelovanja koji često uključuje narušavanje membranskog integriteta stanice, omogućuju im aktivnost širokog spektra naspram patogenih mikroorganizama. Proučavanje AMP-a iz morskih školjaka je bitno iz evolucijske perspektive, ali i njihovog biomedicinskog potencijala u razvoju novih lijekova. Unatoč obećavajućim uspjesima, AMP još nisu zaživjeli svoj puni potencijal u medicini prvenstveno zbog skupih troškova proizvodnje, često visoke toksičnosti po stanice čovjeka i velike nestabilnosti u *in vivo* uvjetima.

Ključne riječi: Antimikrobni peptidi, školjkaši, primjena peptida biomedicini

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilište u Splitu

Rad sadrži: 39 stranica, 6 grafičkih prikaza, 7 tablica, 164 literaturna navoda.

Mentor: Doc. dr. sc. Ana Maravić

Neposredni voditelj: Tomislav Rončević, prof.

Ocjenjivači:

doc. dr. sc. Ana Maravić

doc. dr. sc. Sanja Puljas

Tomislav Rončević, prof.

Rad prihvaćen: 18.09.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Thesis

University of Split
Faculty of Science
Department of biology
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

ANTIMICROBIAL PEPTIDES IN MARINE BIVALVES – IMMUNE RESPONSE AND BIOMEDICAL POTENTIAL

Martin Ripić

ABSTRACT

In recent years, pathogenic bacteria have developed resistance to most of the antibiotic classes in use today, including emergence of multi-resistant „superbacteria“. Therefore, there is a need for a development of new therapeutics, and one of possible solutions are antimicrobial peptides (AMPs), endogenous antibiotics present in all living organisms. Their diverse structures and multimodal mode of action which often includes cell membrane disruption, enables them with broad-spectrum activity against pathogenic microorganisms. Studying AMPs identified from sea shellfish is important from evolutionarily point of view, and also due to their biomedical potential in the development of novel drugs. Despite promising success, AMPs have not yet reached their full potential in medicine, primarily due to expensive production costs, often high levels of toxicity towards human cells and high instability in *in vivo* conditions.

Key words: Antimicrobial peptides, bivalvia, biomedical application

Thesis deposited in the library of Faculty of Science, University of Split.

Thesis consists of: 39 pages, 6 figures, 7 tables and 164 references.

Mentor: Dr. Ana Maravić, PhD, assistant professor

Supervisor: Tomislav Rončević, MSc

Reviewers:

Dr. Ana Maravić, PhD, assistant professor

Dr. Sanja Puljas, PhD, assistant professor

Tomislav Rončević, MSc

Thesis accepted: 18th September 2018

Ovaj rad, izrađen u Splitu 2018. godine, pod vodstvom doc.dr.sc. Ane Maravić i asistenta Tomislava Rončevića, neposrednog voditelja, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnika biologije i kemije.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. RAZRADA TEME.....	2
2.1. Antimikrobni peptidi	2
2.1.1. <i>Antimikrobni peptidi i povijesni osvrt</i>	2
2.1.2. <i>Struktura antimikrobnih peptida</i>	3
2.1.3. <i>Fizikalno kemijske karakteristike antimikrobnih peptida</i>	4
2.1.4. <i>Kategorizacija</i>	6
2.1.5. <i>Mehanizam djelovanja</i>	8
2.2. Morski školjkaši i zarazne bolesti	11
2.2.1. <i>Uzročnici bolesti u morskih školjkaša</i>	11
2.2.2. <i>Mehanizmi obrane morskih školjkaša</i>	14
2.2.3. <i>Antimikrobni peptidi iz morskih školjkaša</i>	15
2.3. Antimikrobni peptidi u medicini	19
2.3.1. <i>Prednosti nad klasičnim antibioticima</i>	19
2.3.2. <i>Prepreke terapijskoj primjeni</i>	20
2.3.3. <i>Rezistencija bakterija na antimikrobne peptide</i>	21
3. SAŽETAK.....	23
4. LITERATURA.....	24

1. UVOD

Antimikrobni peptidi (AMP) su peptidi s različitim brojem aminokiselina i širokim spektrom djelovanja na viruse, bakterije, gljivice i parazite [1]. Sastavni su dio urođenog imunološkog sustava gotovo svih živućih vrsta na Zemlji s direktnom antimikrobnom aktivnošću i/ili signalizacijskim/imunomodulatornim djelovanjem [2,3]. U zadnjim desetljećima, patogene bakterije su razvile rezistenciju na većinu antibiotika koji se danas nalaze u uporabi, bez naznake skorog rješenja za novonastale „superbakterije“ [4,5]. U posljednje vrijeme, primijećena je rezistencija i na kolistin [6], antibiotik koji se desetljećima koristio kao posljednja linija obrane u borbi protiv višestruko rezistentnih Gram-negativnih bakterija [7]. AMP su pojavljuju kao kandidati s velikim naznakama da mogu pomoći riješiti ovaj problem. Njihova strukturalna različitost i multimodalni način djelovanja, koji uključuje permeabilizaciju membrane mikroba i/ili djelovanje unutar stanice inhibirajući sintezu DNA i proteina [1], omogućuje im djelovanje na široki spektar bakterija s malom naznakom razvoja rezistencije.

Morski školjkaši su filtratori i sesilni organizmi koji žive u okolišu bogatom patogenima. Prijašnja istraživanja su pokazala da u jednom mililitru morske vode postoji otprilike 10^6 bakterija i 10^9 virusa [8]. S obzirom da beskralježnjaci, pa tako i morski školjkaši, nemaju stečeni imunitet, u odgovoru na patogene oslanjanju se isključivo na urođeni imunološki sustav u kojem veliku ulogu imaju AMP-ovi [9]. Do sada je u morskim školjkašima identificirano nekoliko obitelji AMP-a, uključujući velike defensine, defensine, mitiline, miticine, mitimicine i mitimacine [8] od kojih su neki direktno uključeni u antimikrobni odgovor. Proučavanje AMP-a u ovim školjkašima važno je iz evolucijske perspektive, ali ujedno i zbog potencijalne biomedicinske primjene identificiranih peptida. Također, nagli razvoj akvakulture, uzgoja školjkaša i povećana ljudska konzumacija morskih plodova dodatno naglašavaju potrebu razumijevanja imunološkog odgovora na patogene kako bi se pomoglo smanjiti širenje i razvijanje mogućih bolesti.

Unatoč poželjnim antimikrobnim karakteristikama identificiranih i/ili dizajniranih AMP-a, njihov terapijski potencijal još nije u potpunosti ostvaren prvenstveno zbog visokih troškova proizvodnje, često visoke toksičnosti po stanice čovjeka, te velikoj nestabilnosti i osjetljivosti u *in vivo* uvjetima [10]. Cilj ovog završnog rada je dati uvid u rasprostranjenost AMP-a, te njihove biofizikalne karakteristike i mehanizme djelovanja. Također, bit će prikazana njihova uloga u mehanizmima obrane morskih školjkaša kao i moguća biomedicinska primjena zajedno s postojećim preprekama.

2. RAZRADA TEME

2.1. Antimikrobni peptidi

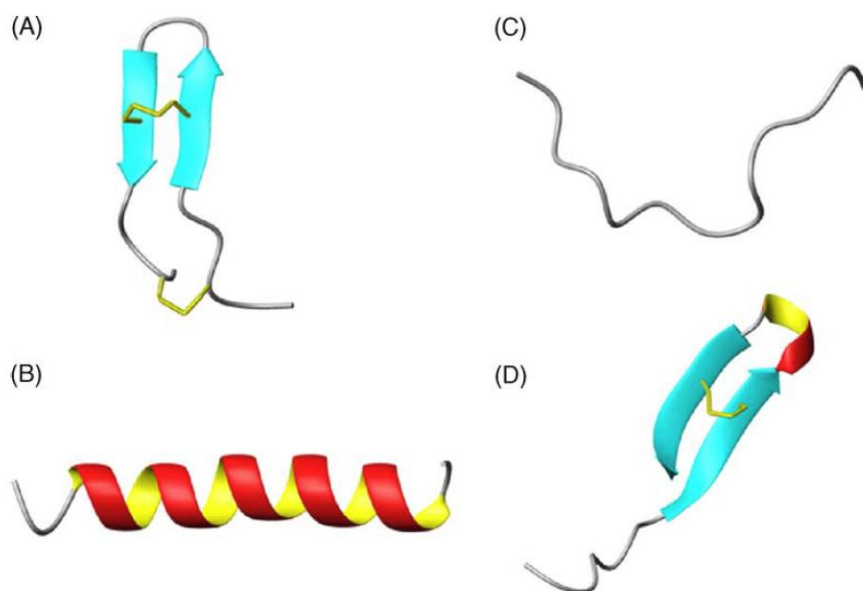
2.1.1. Antimikrobni peptidi i povijesni osvrt

Nagli porast infekcija uzrokovanih bakterijama otpornim na antibiotike doveo je do sve veće potrebe za razvojem terapijskih liječenja uz pomoć antimikrobnih peptida. Antimikrobni peptidi su strukturalno različiti peptidi koji, međutim, imaju određene zajedničke karakteristike kao što su relativno mali broj aminokiselina (5-100), pozitivan naboj i amfipatična struktura [1]. Široka rasprostranjenost antimikrobnih peptida kroz biljno i životinjsko carstvo nam sugerira da su odigrali važnu ulogu u evoluciji mnogostaničnih organizama. Do danas je otkriveno ili sintetizirano više od 5000 antimikrobnih peptida [11], a prvi antimikrobni peptid, gramicidin, koji se pokazao djelotvornim za lokalno liječenje rana i ulkusa [12] je otkrio Dubos 1939. godine iz bakterije roda *Bacillus* [13,14,15]. Dvije godine kasnije otkriven je novi antimikrobni peptid, tirocidin koji se pokazao efektivnim protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija [16], ali istovremeno i toksičnim za ljudske krvne stanice [17]. Te iste godine otkriven je još jedan antimikrobni peptid, purotionin, koji se pokazao djelotvornim u borbi protiv gljivica i određenih sojeva patogenih bakterija [18].

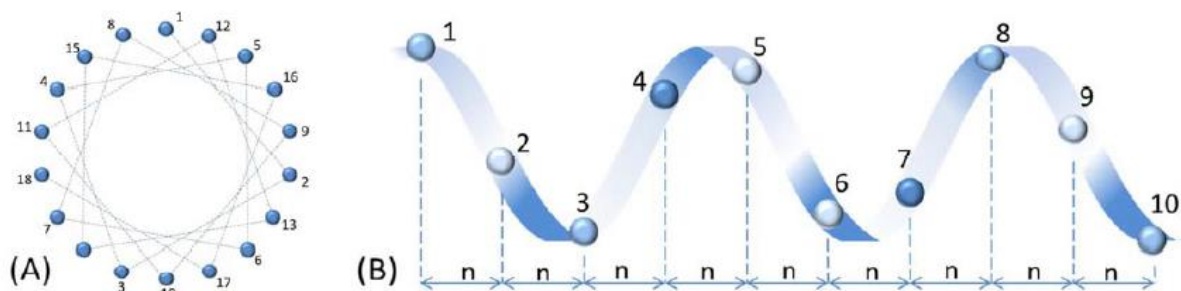
Prvi otkriveni antimikrobni peptid animalnog podrijetla bio je defensin, koji je izoliran iz zečjih leukocita 1956. godine [19]. U narednim godinama otkriveni su još bombinin i laktoferin, a također je dokazano da leukociti izolirani iz zamorca sadrže antimikrobne peptide u svojim lizosomima [20]. Kod životinja, antimikrobni peptidi se uglavnom nalaze na organima i tkivima koji su izloženi patogenima iz zraka, te se vjeruje kako predstavljaju prvu liniju obrane urođenog imunološkog sustava [21,22] protiv virusa, bakterija i gljivica [23]. Na primjer, koža žaba sadrži više od 300 različitih antimikrobnih peptida [24,25]. Većina antimikrobnih peptida se sintetizira u bilo kojem trenutku u specifičnim stanicama kao što su limfociti [23], epitelne stanice u probavnom i mokraćnom sustavu [26,27], fagocitima [28] i limfi, dok nastanak drugog dijela antimikrobnih peptida biva induciran određenim vanjskim podražajima. Antimikrobni peptidi također mogu reducirati imunološki odgovor organizma na povećanu koncentraciju lipopolisaharida, koji bivaju otpušteni od strane bakterija kao odgovor na antibiotsku terapiju. Takva pretjerana reakcija imunološkog sustava domaćina u ekstremnim slučajevima može uzrokovati i sepsu [28,29].

2.1.2. Struktura antimikrobnih peptida

Unatoč velikoj strukturalnoj raznolikosti uzrokovanom mutacijama, koje su se vrlo vjerojatno javile kao posljedica prilagodbe vrsta na određene mikrobiološke uvjete [30], antimikrobni peptidi se mogu klasificirati u četiri velike skupine: α -uzvojnica (npr. magainin 2), β -ploča (koja može biti stabilizirana s jednom ili više disulfidnih veza) (npr. tachiplesin I), neuređena struktura (npr. indolicidin) i petlja koja može biti stabilizirana s disulfidnom vezom (npr. thanatin) (Slika 1). U prirodi se najčešće javljaju α -uzvojnica i β -ploča, dok su α -uzvojnički peptidi do danas najviše proučavani [31]. Kod α -uzvojnice udaljenost između dviju susjednih aminokiselina iznosi 0,15 nm, a kut između njih u odnosu na centar iznosi 100° gledano odozgo (Slika 2) [32].



Slika 1. Pregled struktura antimikrobnih peptida. a) β -ploča, b) α -uzvojnica, c) neuređena struktura, d) petlja [31].



Slika 2. Shematski prikaz α -uzvojničkog AMP-a. Ova slika pretpostavlja istu α -uzvojničku sklonost uvijanju za sve aminokiseline u strukturi peptida. A) α -uzvojnica prikazana odozgo. Kut između dvije susjedne aminokiseline u odnosu na centar iznosi 100 stupnjeva. Iscrtkane linije prikazuju dvije susjedne aminokiseline u primarnoj strukturi. B) Bočni prikaz peptida. Udaljenost između dviju susjednih aminokiselina iznosi 0,15 nm. [4]

Međutim, iako se većina antimikrobnih peptida može klasificirati u jednu od ove 4 skupine, postoje i AMP koji ne zauzimaju takav prostorni raspored [33], dok neki od njih sadrže dvije različite strukturalne komponente (npr. α -uzvojnica i petlja) [34]. Također, interesantno je da mnogi peptidi formiraju svoju aktivnu strukturu tek kada dođu u doticaj s membranom ciljne stanice [35].

Jedno od najvažnijih svojstava antimikrobnih peptida je brzo uništavanje ciljanih stanica te sinergijsko djelovanje s antibioticima [36]. Zbog toga što su građeni samo od aminokiselina, relativno je lako modificirati njihovu strukturu ili ih imobilizirati na različitim površinama [37]. Danas je moguće u potpunosti stvoriti sintetički peptid pomoću kemijske sinteze [38] ili koristeći sisteme rekombinantne ekspresije [39,40]. Međutim, kako bi sintetizirali novi peptid koji ima poželjna antimikrobna svojstva potrebno je biti upoznat s fizikalno – kemijskim karakteristikama antimikrobnih peptida.

2.1.3. Fizikalno kemijske karakteristike antimikrobnih peptida

Do danas još nije u potpunosti objašnjena veza između strukture AMP-a i njihove aktivnosti ili mehanizma djelovanja, pa određeni peptidi sa sličnim strukturama mogu imati u potpunosti različite mehanizme djelovanja. Iako nije moguće u potpunosti povezati strukturu peptida s njihovom aktivnošću, određene fizikalno kemijske karakteristike mogu utjecati na antimikrobnu aktivnost AMP-a i njihovu ciljnu specifičnost: veličina, naboj, hidrofobnost, amfipatičnost, uvijenost i topljivost [41].

2.1.3.1. Veličina

Veličina AMP-a je bitna za njegovu aktivnost s obzirom da je potrebno najmanje 7 do 8 aminokiselina kako bi se formirala amfipatična struktura s hidrofilnim i hidrofobnim

aminokiselinama na suprotnim strana peptidne makromolekule [42].. Osim toga, duljina može utjecati i na citotoksičnost peptida. Prijašnja istraživanja su pokazala da 15 aminokiselina dug, C-terminalni fragment melittina ima znatno nižu toksičnost naspram eritrocita izoliranih iz štakora [43].

2.1.3.2 Naboj

Ukupni naboj antimikrobnog peptida čini suma svih ionizirajućih skupina peptida i može biti negativan ili pozitivan. Naboj peptida je vrlo bitan pri početnoj interakciji s negativno nabijenim membranama stanica. Mijenjajući naboj antimikrobnog peptida mogu se mijenjati njegova antimikrobna i hemolitička svojstva kako bi se postiglo selektivnije uništavanje mikroba bez većih posljedica na stanicu domaćina [42].

2.1.3.3 Uvijenost

Uvijenost predstavlja sposobnost antimikrobnog peptida da tvori uvijene strukture. Vrlo je važna za određivanje moguće citotoksičnosti na eukariotske stanice [32]. Oren i sur. [44] su pokazali da se reduciranjem uvijenosti uvođenjem D-aminokiselina u primarnu strukturu smanjuje hemolitička aktivnost peptida, povećava otpornost na proteaze, dok antimikrobna aktivnost ostaje nepromijenjena.

2.1.3.4 Hidrofobnost

U primarnoj strukturi prirodnih peptida skoro 50 posto aminokiselinskih ostataka je hidrofobno [41]. U većini slučajeva povećanje hidrofobnosti može rezultirati povećanjem antimikrobne aktivnosti [32], dok se smanjenjem hidrofobnosti antimikrobna aktivnost najčešće smanjuje [45]. Čini se postoji optimalna hidrofobnost za svaki AMP, iznad koje njegova aktivnost drastično opada [46]. Također, određene studije su pokazale da povećanje hidrofobnosti AMP-a može promijeniti raspon ciljanih stanica [47,48]. Npr. magainin je antimikrobni peptid koji je efektivan samo protiv Gram-negativnih bakterija. Međutim, određeni sintetički analozi s većom hidrofobnosti mogu djelovati i na Gram pozitivne bakterije, ali ujedno i na eukariotske stanice [49].

2.1.3.5. Amfipatičnost

Amfipatičnost je još jedno važno svojstvo AMP-a kojim se osigurava aktivnost i interakcija s mikrobnim membranama. Fernandez-Vidal i sur. [50]. su pokazali da je amfipatičnost važnija od hidrofobnosti s obzirom da je nužna za snažno odjeljivanje (hidrofilan sloj/hidrofoban sloj) na površini bakterijske membrane.

2.1.3.6. Topljivost

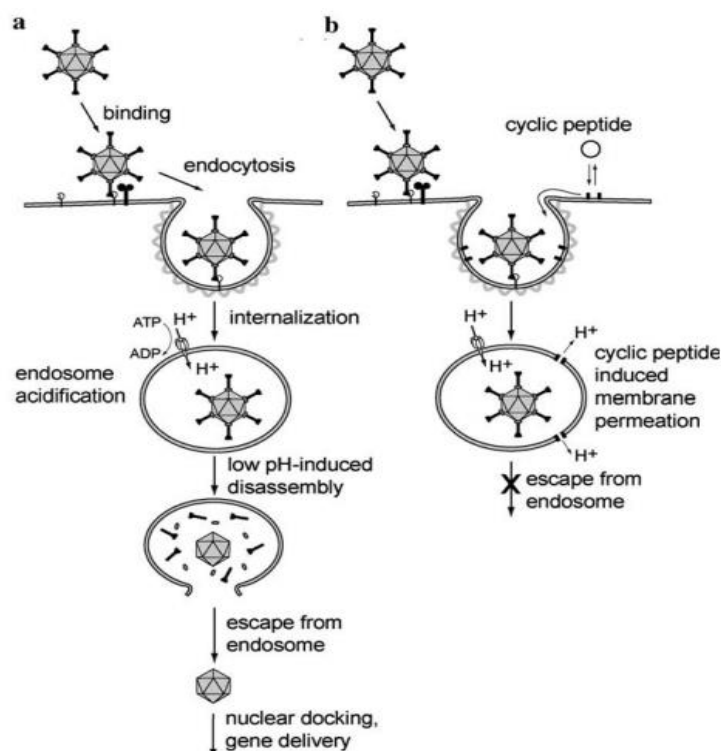
S obzirom da antimikrobni peptidi djeluju na ili prolaze kroz lipidne membrane, oni trebaju biti topljivi u vodenim okolinama. Ako antimikrobni peptid stvori agregat, izgubit će sposobnost djelovanja na staničnu membranu.

2.1.4. Kategorizacija

Antimikrobni peptidi se mogu kategorizirati s obzirom na njihovu metu, te s obzirom na mehanizam djelovanja na ciljane stanice.

2.1.4.1. Antivirusni peptidi

Zbog vrlo jednostavne građe virusa; DNA ili RNA omotana kapsidom, virusi su nesposobni za samostalnu reakciju metabolizma, to jest ne mogu preživjeti izvan stanice domaćina [51]. Antivirusni peptidi neutraliziraju viruse tako što se integriraju u ovojnicu virusa ili membranu stanice domaćina (ciklički D,L, α -peptidi ugrađeni u membranu stanice; Slika 3). Integriranjem u ovojnicu virusa peptidi uzrokuju nestabilnost čineći tako viruse nesposobnim za uzrokovanje infekcije kod stanice domaćina [52]. Također antivirusni peptidi mogu reducirati moć vezivanja virusa za stanice [53] ili spriječiti ulazak virusa u stanicu okupiranjem specifičnih receptora na stanici. Npr. heparan sulfat je važan za vezanje čestica *Herpes simplex* virusa (HSV) na površinu stanične membrane. S obzirom da je heparan sulfat negativno nabijena molekula, određeni peptidi kao npr. lactoferrin se mogu vezati na tu molekulu i spriječiti virus-receptor interakciju [54,55,56]. Još jedan način sprječavanja virusnih infekcija je ulazak peptida u citoplazmu i organele i izazivajući promjene u ekspresiji gena stanica domaćina [42].



Slika 3. a) Shematski prikaz ranog stadija infekcije uzrokovane adenovirusom. Nakon vezivanja adenovirusa za njegov receptor, virus ulazi pomoću endocitoze uzrokovane klatrinom. Zatim u endosomu, aktivnim zakiseljavanjem dolazi do djelomičnog raspada kapside adenovirusa ovisne o pH što omogućuje bijeg iz endosoma. b) Membrana koja u sebi ima ugrađene D,L- α -peptide tijekom ulaska virusa, sprječava izlazak virusa iz endosoma tako što onemogućuje zakiseljavanje. [57]

2.1.4.2. Antibakterijski peptidi

Antibakterijski peptidi su do danas najviše proučavani i većina ih je pozitivno nabijena. Uglavnom napadaju staničnu membranu uzrokujući raspadanje lipidnog dvosloja [58,59]. Većina ovih peptida je amfipatična i sadrži hidrofilne i hidrofobne domene. Takva organizacija omogućuje peptidima da se vežu na lipidne komponente (hidrofobna regija) i na fosfolipidne grupe (hidrofilna regija) [60]. S druge strane, određeni peptidi (npr. buforin II) mogu ubiti bakterije ne mijenjajući integritet membrane tako da inhibiraju neke bitne stanične procese kao što su sinteza proteina ili replikacija DNA [61].

2.1.4.3. Antifungalni peptidi

Za razliku od bakterija kojima je glavna komponenta stanične stijenke peptidoglikan, gljivice u svojoj stijenci nemaju peptidoglikana, već kod njih uglavnom dominira hitin za koji se AMP mogu uspješno vezati. Slično kao i kod antibakterijskih peptida, antifungalni peptidi mogu ubiti gljivice ciljajući staničnu stijenku ili unutarstanične organele. Peptidi koji ciljaju staničnu

stijenku ubijaju ciljane stanice tako što narušavaju integritet membrane [62], povećavajući propusnost plazma membrane [63] ili formiraju pore u membrani [64].

2.1.4.4. Antiparazitski peptidi

Antiparazitski peptidi su mala klasa peptida uspoređujući s ostale tri klase. Prvi otkriveni antiparazitski peptid bio je magainin, koji je aktivan naspram *Paramecium caudatum* [65]. Kasnije su otkriveni ili pronađeni novi peptidi s antiparazitskim svojstvima, a iako su neki paraziti mnogostanični organizmi, mehanizam djelovanja ovih peptida se ne razlikuje od prijašnjih opisanih – ubijaju stanice djelujući direktno na membranu.

2.1.5. Mehanizam djelovanja

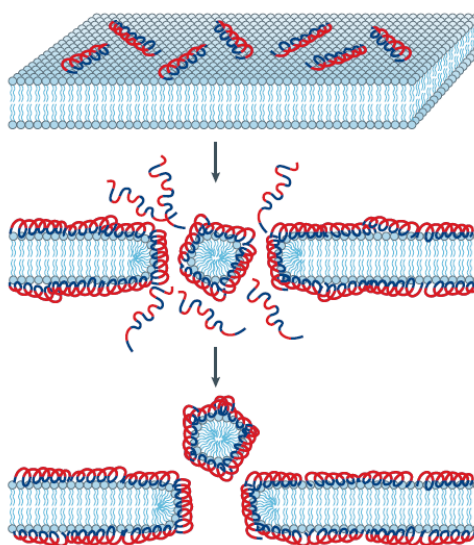
Dok antibiotici ciljaju određene stanične komponente, antimikrobni peptidi djeluju narušavajući stanični integritet, inhibirajući sintezu proteina, DNA i/ili RNA ili reagiraju s određenim unutarstaničnim metama [42]. Generalno, jedan AMP je efektivan protiv jednog razreda mikroorganizama, npr. gljiva ili bakterija [28]. Međutim, postoje iznimke i danas je poznato da jedan AMP može imati različite mehanizme djelovanja protiv različitih tipova mikroorganizama.

2.1.5.1 Membranski aktivni antimikrobni peptidi

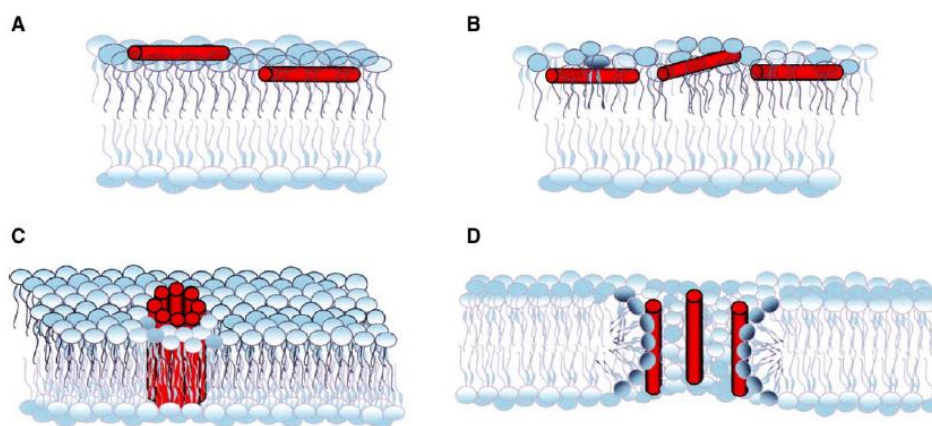
Čak i da je meta AMP-a unutar stanice, za uspješno djelovanje peptida nužna je prvotna interakcija sa staničnom membranom. Većina membranski aktivnih antimikrobnih peptida je amfipatična (kationska i hidrofobna površina) što im omogućuje inicijalnu elektrostatsku interakciju s negativno nabijenim skupinama stanične membrane te ulazak u unutrašnjost membrane [42]. Potom hidrofobni dio peptida pomaže unijeti peptid u staničnu membranu. Ionska i hidrofobna interakcija peptida s bakterijskom membranom ponajviše ovisi o dva svojstva, naboju i hidrofobnosti peptida. Predloženi mehanizmi djelovanja AMP na staničnu membranu su dani u Tablici 1 i Slikama 4 i 5.

Tablica 1. Mehanizmi djelovanja membranski aktivnih antimikrobnih peptida [1].

Interakcijski model	Mehanizam	Reference
<i>Carpet like</i> (nalik djelovanju deterdženta)	Peptidi prekrivaju cijelu membranu i postepeno okružuju male dijelove membrane, te djelujući poput deterdženta, uzrokuju formiranje micela. Uz to, molekule antimikrobnog peptida stvaraju pore u lipidnom dvosloju omogućujući dodatnim peptidima pristup membrani.	[66-68]
Stanjivanje membrane	Antimikrobni peptidi ulaze u samo jednu stranu lipidnog dvosloja i formiraju rupu između lipidnih molekula (u regiji lanca). Ta rupa stvara silu koja vuče susjedne lipidne molekule da je popune.	[69-71]
Toroidalne pore	Nakon inicijalne interakcije s membranom, antimikrobni peptidi ulaze u lipidni dvosloj čineći poru. Razlika u odnosu na “bačva-motka” (vidi dolje) je da je peptid konstanto povezan s glavom lipidne molekule. Kako ulazi u membranu, uzrokuje savijanje jednog lipidnog sloja.	[61,72]
Bačva-Motka model	Peptidi se formiraju paralelno na staničnoj membrani što nalikuje motkama/prečkama. Kad se dosegne dovoljno visoka koncentracija peptida, oni formiraju klupko nalik bačvi. Peptidi ulaze okomito u membranu – hidrofobni dio je okrenut prema lipidnoj jezgri a hidrofilni prema unutrašnjosti pore.	[59,73,74]



Slika 4. Carpet model [58]



Slika 5. Modeli formiranja transmembranskih kanala. A) Alfa uzvojnički peptidi se prvo vežu paralelno za membranu, ili samo površno (lijevo) ili ugrađeni ispod površine sloja. B) Peptidi se nastavljaju akumulirati u blizini membrane ili na njoj, uzrokujući narušavanje integriteta iste ili razrjeđivanje membrane. Ovaj korak može, ali i ne mora uključivati agregiranje peptida. C) Bačva-motka model. D) Toroidalna pora [75].

2.1.5.2. Unutarstanični aktivni antimikrobni peptidi

Više od jedne trećine svih proteina bakterijske stanice je vezano uz membranu, te su stoga uključeni u brojne procese od izrazite važnosti za stanicu. Među ostalim, tu spadaju aktivni transport hranjivih tvari, respiracija, proton motorna sila, ATP generacija i unutarstanična komunikacija [76]. Funkcije tih proteina mogu biti narušene djelovanjem antimikrobnih peptida što sugerira da peptidi mogu ubiti ciljanu stanicu i bez narušavanja integriteta membrane. Također, antimikrobni peptidi tog tipa djeluju unutar stanice tako što inhibiraju sintezu proteina i DNA (npr. PR-39 izoliran iz svinje) [77,78]. Određeni AMP, mogu inhibirati proteaze koje izlučuju mikrobi, (npr. histatin 5 koji na taj način sprječava razaranje parodontnog tkiva prouzrokovano *Bacteriocides gingivalis*), ili mogu aktivirati protein autolizin u ciljanoj stanici koji uzrokuje potom uzrokuje raspad stanice [79,80].

Otkriće da antimikrobni peptidi mogu inhibirati unutarstanične puteve [77] nam sugerira da postoji mehanizam staničnog unosa peptida. Dva mehanizma su predložena: direktna penetracija i endocitoza [81]. Prema Jonesu [82], stanični unos antimikrobnih peptida se može odvijati preko endocitoze što uključuje makropinocitozu i receptor ovisnu endocitozu. U makropinocitozi stanična membrana se uvija prema unutra i stvara vezikule uz pomoć proteina dinamina. Te vezikule nazivamo makropinosomi. Kod receptor ovisne endocitoze, dio membrane obložen sa klatrinom ili kaveolinom se počinje uvlačiti prema unutrašnjosti stanice do nastanka vezikula [82].

2.2. Morski školjkaši i zarazne bolesti

Morski školjkaši, latinski *Bivalvia* spadaju u razred mekušaca odnosno Mollusca. To su životinje koje žive uglavnom u području bentosa, a kako se često uzgajaju u prehrambene svrhe mnogo njih se nalazi u priobalnim područjima gdje su izloženi abiotičkim i biotičkim faktorima. S obzirom da školjkaši spadaju u skupinu filtratora, a žive u okolišu bogatom patogenima [8] postoji velika mogućnost nakupljanja mikroorganizama u njihovim tkivima koji mogu biti opasni za njih same ili čovjeka kao potencijalnog konzumenta.

U današnje vrijeme, najčešće bolesti među morskim školjkašima su bonamioza i infekcija izazvana herpes virusom, te su raširene diljem svijeta kao posljedica globalizacije [8]. S obzirom da se bolesti među školjkašima šire brzo i horizontalno, moguće je da su farme za uzgajanje pridonijele brzom širenju određenih bolesti, naročito među populacijom namijenjenoj komercijalnoj eksploataciji. Kako bi spriječili daljnje širenje bolesti Svjetska organizacija za zdravlje životinja izdala je niz preporuka i standarda kako bi se postojeće stanje u industriji morskih životinja (uključujući školjkaše) poboljšalo. Školjkaši su često zahvaćeni bolestima koje najčešće uzrokuju virusi, bakterije, paraziti i praživotinje, a važan dio njihovog imunološkog odgovora čine antimikrobni peptidi [8].

2.2.1. Uzročnici bolesti u morskih školjakaša

2.2.1.1. Infekcije izazvane virusima

Većina virusa koja je danas povezana s bolestima koje izazivaju visoku stopu mortaliteta kod školjkaša pripada porodicama *Herpesviridae* i *Iridoviridae*, a u manjoj mjeri virusima iz porodica *Picornaviridae*, *Papovaviridae*, *Birnaviridae*, *Retroviridae* i *Reoviridae* (Tablica 2) [83]. S obzirom na uzročnike, infekcije se klasificiraju u dvije glavne kategorije:

- 1) Infekcije izazvane Herpes virusima. Prvu infekciju izazvanu herpes virusom opisali su Farley i sur. [84] u vrste *Crassostrea virginica*. 2009. godine otkriven je Oyster herpes virus tip 1 (OsHV-1) koji je povezan s visokom stopom mortaliteta kamenica u Irskoj, Italiji, Nizozemskoj, Španjolskoj i Ujedinjenom Kraljevstvu. U ljeto 2012. i 2013. OsHV-1 je uzrokovao visoku smrtnost *Scapharca broughtonii* u Kini. Mlađe jedinke su bile više pogođene od odraslih, a sama bolest je kod ličinki izazvala redukciju u hranjenju i plivanju što je kod nekih slučajeva znalo povisiti mortalitet na 100 posto.
- 2) Infekcije izazvane Irido virusima. Škržna bolest je bolest uzrokovana *gill necrosis virus* (GNV), koji je odgovoran za veliku smrtnost kod vrste *Crassostrea angulata* 70-ih godina prošloga stoljeća. U današnje vrijeme Irido virusi su rijetki u Europi.

Tablica 2. Pregled glavnih virusnih infekcija u morskih školjkaša [8].

Bolest (Patogeni uzročnik)	Domaćin	Efekti na domaćinu	Geografska rasprostranjenost	Reference
Herpes virus infekcija (<i>Oyster herpes virus</i>)	Uglavnom uzgojene ličinke vrsta <i>Crassostrea gigas</i> i <i>Ostrea spp.</i>	Lezije na plaštu, degradacija	Europa, Meksiko, Australija, Novi Zeland, SAD, Kina	[85,86,87]
<i>Gill necrosis virus</i> (GNV) Hemocit inficirajući virus (HIV) <i>Oyster velar virus</i> (OVV)	<i>Crassostrea angulata</i> i <i>C.gigas</i>	Raspadanje škržnih filamenata Hemociti inficirani virusom	Francuska, Portugal, Španjolska	[88]

2.2.1.2. Infekcije izazvane bakterijama

S obzirom da se školjkaši hrane filtriranjem morske vode, u svojim organizmima koncentriraju visoku i raznoliku količinu bakterija. Neke od tih bakterija mogu biti patogene za ličinke u uzgoju, ali ne i za one u divljini. Patogenost bakterija uvelike ovisi o vrsti domaćina, životnom stadiju domaćina, koncentraciji bakterija te okolišnim čimbenicima [8]. Dijagnostika bakterijskih bolesti u školjkaša temelji se na makroskopskoj inspekciji ljuštura u kombinaciji sa PCR-om što je ujedno najosjetljivija i brža metoda [90]. Gram-negativne bakterije su odgovorne za bacilarnu nekrozu u velikom broju vrsta školjkaša, te uzrokuju smrtnost od čak 90 posto u odraslih životinja, dok su se mlađi oblici školjkaša pokazali otpornijim [90]. Od Gram-pozitivnih bakterija, glavna patogena vrsta je *Nocardia crassostreae*. Mortalitet se penje do 35 posto, a inficirane životinje pokazuju zeleno žute tvorevine u plaštu, škragama, aduktoru i srčanom mišiću što je povezano s intenzivnom infiltracijom hemocita oko kolonija *Nocardia* (Tablica 3) [91]

Tablica 3. Pregled glavnih bakterijskih infekcija u morskih školjkaša [8].

Bolest (Patogeni uzročnik)	Domaćin	Efekti na domaćinu	Geografska rasprostranjenost	Reference
Ličinačke i juvenilne vibrioze(<i>Vibrio</i> <i>anguillarum</i> , <i>V.</i> <i>tubiashi</i> , <i>V.</i> <i>alginolyticus</i> , <i>V.</i> <i>splendidus</i> , <i>V.aestuarianus</i> , <i>V.</i> <i>neptunius</i>)	Širok spektar uzgajanih vrsta	Nekroza tkiva, mortalitet ličinki čak do 100 posto	U svim morima gdje se školjkaši uzgajaju	[92,93]
Bolest smeđeg prstena (<i>Vibrio tapetis</i>)	<i>Ruditapes</i> <i>philippinarum</i>	Smeđe naslage na ljusci, degeneracija probavne žlijezde te poremećaji u metabolizmu, smrt	Cijela Europska obala Atlantskog oceana do sjeverne Afrike, Koreja	[94,95]
<i>Roseovario oyster</i> <i>disease</i> (<i>Roseovarius</i> <i>crassostreae</i>)	Mladunci vrste: <i>Crassostrea</i> <i>virginica</i> , duljina ljuske manja od 25 mm	Reduciran rast, fragilni razvitak ljuske, lezije plašta, mortalitet do 90 posto	SAD	[96]
Nokardioza paciifičke kamenice (<i>Nocardia</i> <i>crassostreae</i>)	<i>Crassostrea</i> <i>gigas</i> , <i>Ostrea</i> <i>edulis</i>	Zeleno žute tvorevine u plaštu, škrigama, aduktoru i srčanom mišiću, smrtnost do 35 posto	Zapadna obala sjeverne Amerike, Japan, Sredozemno more	[97,98]

2.2.1.3. Infekcije uzrokovane protistima

Najvažniji patogeni protisti pripadaju rodovima *Bonamia*, *Perkinsus*, *Haplosporidium* i *Marteilia*, te oni uglavnom napadaju kamenice i kunjke izazivajući velike komercijalne štete u marikulturi. Najpoznatiji protisti koji uzrokuju bolesti su *Perkinsus marinus*, *Bonamia ostreae*, *Bonamia exitiosa*, *Perkinsus olseni*, *Marteilia refrigens* i oni su trenutno pod nadzorom od strane Svjetske organizacije za zdravlje životinja (Tablica 4). Rasprostranjenost i sam intenzitet infekcija se uobičajeno povisuje tijekom toplijih sezona, ovisno o salinitetu i temperaturi [99]. Danas bonamioza predstavlja 63 posto bolesti u školjkaša uzrokovanih protistima u Europi

[100]. Bolest uglavnom zahvaća hemocite koji bivaju inficirani patogenom, patogen se razmnožava unutar krvnih stanica i zatim širi u sva tkiva. Mortalitet uzrokovan bonamiozom se penje čak do 90 posto. Druga najraširenija bolest je martelioza, čiji uzročnici su čak zabilježeni u Hrvatskoj u vrsti *Ostrea edulis*. Martelioza je još poznata kao Aberova bolest i *Queensland Unknown disease*, uglavnom izaziva poremećaje u probavnom sustavu, a mortalitet se penje do 90 posto. Treća najraširenija bolest je perkinsoza uzrokovana od strane *Perkinsus marinus*. To je bolest derme, a patogen inficira i razmnožava se u probavnom sustavu i vezivnom tkivu izazivajući nekroze i hemolizu hemocita i lizu tkiva [101].

Tablica 4. Pregled infekcija uzrokovanih protistima u morskih školjkaša [8].

Bolest (Patogeni uzročnik)	Domaćin	Efekti na domaćinu	Geografska rasprostranjen ost	Reference
Bonamioza (<i>Bonamia ostreae</i> , <i>B.exitiosa</i> , <i>B.perspora</i> , <i>B.roughleyi</i>)	Veliki broj vrsta roda <i>Ostrea</i>	Žuta boja tkiva, velike lezije plašta i škrga, puknuće vezivnog tkiva	Europa, zapadna obala Kanade i SAD-a, Novi Zeland	[102- 104,105,1 06,107,10 8]
Bolest probavne žlijezde (<i>Marteilia refringens</i>)	<i>Ostrea edulis</i> , <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Blijeda boja probavne žlijezde, nekroze tkiva, prestanak rasta	Hrvatska, Italija, Grčka, Albanija, Francuska, Maroko, Portugal, Španjolska	[109-112]
QX bolest (<i>Marteilia sydneyi</i>)	<i>Saccostrea glomerata</i> , <i>Saccostrea spp.</i>	Nekroza probavne žlijezde, narušavanje općeg stanje, absorpcija gonada	Novi Južni Wales, Zapadna Australija	[113,114]
Bolest derme (<i>Perkinsus marinus</i>)	<i>Crassostrea virginica</i>	Narušavanje općeg stanja, visoke stope smrtnosti ovise o temperaturi i salinitetu	Meksički zaljev, paciifička obala Meksika, Kalifornijski zaljev, Brazil	[115-119]

2.2.2. Mehanizmi obrane morskih školjkaša

Za razliku od kralježnjaka, morskim beskralježnjacima (pa tako i školjkašima) nedostaje stečena imunost bazirana na T-limfocitima i imunoglobulinu, pa se u odgovoru na patogene oslanjaju isključivo na urođene imunološke mehanizme [9]. Stanična imunost uključuje enkapsulaciju, formaciju nodula i fagocitizu. Imunološki odgovor hemocita se zasniva na njihovoj ancestralnoj ulozi u digestiji hrane i transportu nutrijenata [120], a osim što putem

fagocitoze sudjeluju u prepoznavanju i uništavanju živih i neživih stranih čestica, također luče antimikrobne i citotoksične supstance u hemolimfu [121]. Osim hemocita, morski beskralježnjaci posjeduju ekstracelularne alate za obranu poput lektina, lipopolisaharida, β -1-3 glukan vežućih proteina i antimikrobnih peptida [122-124]. Lektini su proteini koji prepoznaju ugljikohidrate te imaju heterogenu mogućnost vezanja na ugljikohidrate na površinu mikroba. Najčešća dva tipa lektina su C-lektini koji imaju afinitet prema glikoproteinima i glikolipidima i S-lektini koji imaju afinitet prema β -galaktidozi [8]. Antimikrobni peptidi također zauzimaju važnu ulogu u imunološkom odgovoru, a do sada je identificirano nekoliko klasa AMP-a u školjkašima s različitim strukturama i spektrom djelovanja.

2.2.3. Antimikrobni peptidi iz morskih školjakaša

S obzirom da morskim školjkašima nedostaje stečena imunost, a hrane se filtriranjem morske vode postavlja se pitanje kako uspješno preživljavaju u okolišu s velikom količinom patogena poput virusa, bakterija, gljivica i parazita [8]. Srećom, kao jedno od sredstava obrane koje školjkaši izlučuju su antimikrobni peptidi, od kojih su neki uspješno izolirani iz školjakaša. Prvi AMP iz morskih školjakaša identificiran je 1996. godine, kada su Hulbert i sur. izolirali peptid iz vrste *M. galloprovincialis* [8], nakon čega su izolirani mnogi drugi antimikrobni peptidi, prvenstveno iz *M. galloprovincialis* i *M. edulis*. Mitta i sur. su dokazali da se AMP u školjkašima sintetiziraju u hemocitima i pohranjuju u granulama hemocita [125,126,127]. Većina tih AMP-a je pozitivno nabijena i bogata cisteinom [8], a prema primarnoj strukturi možemo ih podijeliti u nekoliko skupina: defensini, mitilini, miticini, mitimicini, veliki defensini i mitimacini [8].

2.2.3.1. Defensini

Defensini spadaju među najbolje karakterizirane peptide izolirane iz morskih školjakaša. U dagnjama je identificiran peptid dug 39 aminokiselina i prisutan u dvije izoforme (MGD1 i MGD2) (Tablica 5.) sa značajnom homologijom u sekvenci [8]. Ova klasa peptida identificirana je i opisana i u kamenicama, a prvi takav peptid je identificiran u vrsti *Crassostrea virginica* [128] Defensine izlučene iz dagnje karakterizira to što su stabilizirani s 4 disulfidna mosta (Cys4-Cys25, Cys10-Cys33, Cys14-Cys35 i Cys21-Cys38 kod MGD1) za razliku od defensina izlučenih iz člankonožaca koji su stabilizirani s 3 takve veze [8]. MGD1 [129], peptid iz klase defensina člankonožaca, identificiran u *M. galloprovincialis*, i MGD2 [126] su slični po veličini i aminokiselinskoj sekvenci (80% sličnosti). Oba peptida sadrže *open reading frame* koji kodira sekvencu dugu 81 aminokiselinu uključujući 21-aminokiselinski ostatak N-terminala s

izraženo hidrofobnom jezgrom koja predstavlja signalnu domenu. Zatim slijedi 39 aminokiselinskih ostataka duga sekvenca koja odgovara aktivnom defensinu i 21 – aminokiselinski ostatak C-terminala [8]. MGD-ovi su najčešće aktivni protiv Gram-pozitivnih bakterija, ali se MGD2 pokazao aktivnim i protiv Gram-negativnih bakterija [8].

2.2.3.2. Mitilini

Drugu skupinu AMP-a iz morskih školjkaša čine mitilini (Tablica 5.) kod kojih je identificirano pet izoformi A, B, C, D i G1 [8]. Mitilin A i B su izolirani iz plazme vrste *M. edulis*, dok su mitilini B, C, D i G1 izolirani iz hemocita vrste *M. galloprovincialis* [121]. Mitilini A, B, C i D su se pokazali izuzetno aktivnim protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, dok se mitilin G1 pokazao aktivnim samo protiv Gram pozitivnih bakterija. Mitilini B i D su također pokazali potencijal u borbi protiv nitaste gljivice *Fusarium oxysporum*. Nadalje, eksperimenti za utvrđivanje kinetike bakterijskog rasta su pokazali da je pri visokim koncentracijama potrebno nekoliko sati inkubacije sa mitilinom D i G1 kako bi se ubilo sve bakterije, dok mitilini A i B to učine za samo nekoliko minuta [8]. Mitilin B je također pokazao potencijal za antiviralnu aktivnost [8].

2.2.3.3 Miticini

Još jedna klasa peptida bogata cisteinima je izolirana iz vrste *M. galloprovincialis* i nazvana je miticini (Tablica 5). [127]. Aktivna molekula je duga 40 aminokiselina i ima 4 intra-molekularna disulfidna mosta (kao i defensini). Do danas su izolirane tri izoforme miticina: A, B i C, od kojih je miticin C najviše zastupljen u odraslih mekušaca [8]. Sve izoforme su aktivne protiv Gram pozitivnih bakterija i ponekad protiv Gram negativnih bakterija, a miticin C pokazuje i antiviralnu aktivnost. Svi do sada opisani peptidi imaju antimikrobnu aktivnost, ali sa značajnim razlikama u kinetici. Kada su različiti peptidi bili inkubirani s vrstom *M. luteus*, više od 2 sata bilo je potrebno mitilinu D i miticinu A i G1 kako bi ubili sve bakterije, dok su mitilini A, B i C i defensin MGD1 to obavili za svega nekoliko minuta [130].

2.2.3.4. Mitimicini, mitimacini i veliki defensini

Mitimicin (Tablica 5) je striktno antifungalni peptid koji sadrži 12 cisteina s molekularnom masom od 6.2 kDa, a izoliran je iz plazme vrste *M. edulis* [131]. Nedavno su iz vrste *M. coruscus* izolirane dvije nove skupine AMP-a. U prvu skupinu, mitimacine, spada antimikrobni peptid myticusin 1 [132], te se sastoji od 104 aminokiselinska ostatka uključujući 10 cisteina. Myticusin 1 je pokazao izraženiju antimikrobnu aktivnost protiv Gram-pozitivnih u odnosu na Gram-negativne bakterije i gljivice. Iz iste vrste je izoliran i AMP koji spada u skupinu velikih

defensina. Ovaj 55 aminokiselinskih ostataka dug peptid je pokazao značajnu aktivnost protiv gljivica i Gram-pozitivnih bakterija i karakterizira ga hitin-vezujuća domena i 6 cisteina koji tvore tri intra molekularna disulfidna mosta [8]. Zanimljivo, iz vrste *Venerupis philippinarum* je izolirana aminokiselinska sekvenca (naziva VpBD) koja ima slična obilježja kao i antimikrobni peptidi. Prikaz i razmak između cisteina i njihovih bočnih aminokiselina indicira da VpBD pripada skupini velikih defensina. Veliki defensini se generalno sastoje od hidrofobne regije na N-terminalu, jednog C-terminala koji je bogat cisteinom i pozitivno nabijen i 6 cisteinskih ostataka raspoređenih tako da tvore 1-5, 2-4, 3-6 disulfidne mostove u peptidu, što je slično defensinima sisavaca [8]. Antimikrobni peptid naziva *cgMolluscidin*, molekularne mase 5.5 kDa i dužine 55 aminokiselinskih ostataka je nedavno izoliran iz zakiseljenih škrga vrste *C.gigas*. Taj peptid nema nikakvih sličnosti sa dosad otkrivenim antimikrobnim peptidima, te se ne može svrstati u nijednu od postojećih klasa, a pokazuje snažnu antimikrobnu aktivnost protiv Gram-pozitivnih bakterija (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* i *S.aueus*) i Gram-negativnih bakterija (*E.coli*, *Salmonella enterica* i *Vibrio parahaemolyticus*) [8].

Tablica 5. Pregled antimikrobnih peptida iz školjkaša [8].

Ime	Izvor	Sekvenca	Dužina	Naboj	%Hidrofobni ostaci	Struktura	Antimikrobna aktivnost	Reference
Defensin MGD1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	GFGCPNNYQCHRHCKSIPGRCGGYCG GWHRLPCTCYRCG	39	5	30	Kombinirana uzvojnica i β -ploča	Gram+	[129]
Defensin MGD2	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	GFGCPNNYACHQHCKSIRGYCGGY CAGWFRLRCTCYRCG	39	5	38	Kombinirana uzvojnica i β -ploča	Gram+ i Gram-	[125]
Mitilin A	<i>Mytilus edulis</i>	GCASRCKAKCAGRRCKGWASASFR GRCYCKCFRC	34	10	47	Kombinirana uzvojnica i β -ploča	Gram+ i Gram-,	[131]
Mitilin B	<i>Mytilus edulis</i>	SCASRCKGHCRARRCGYYVSVLYRG RCYCKCLRC	34	9	41	Kombinirana uzvojnica i β -ploča	Gram+ i Gram-, Antivirusno	[131]
Miticin A	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	HSHACTSYWCGKFCGTASCTHYLC RVLHPGKMCACVHCSR	40	4	45	Kombinirana uzvojnica i β -ploča	Gram+ i Gram-, Antifungalno	[127]
Miticin B	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	HPHVCTSYYSKFCGTAGCTRYGCR NLHRGKLCFCLHCSR	40	6	37	Kombinirana uzvojnica i β -ploča	Gram+ i Gram-, Antifungalno	[127]
Miticin C	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	QSVACTSYYSKFCGSAGCSLYGCV LLHPGKICYCLHCSR	40	3	35	Kombinirana uzvojnica i β -ploča	Gram+ i Gram-, Antifungalno	[133]

Mitimicin	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MSLVLRMTLLFVVCVVIGMSNAA CCHKPFWKHCWDCTAGTPYCGYRS CNIFGCGCTCRTEPYGKSCYERGNR CRCYTDKRKRRLSLSFEDISPNKFAGL DINS DGLIEQFEFIKALEQMDIIDNTT MFHHWSIMDEDDKDGTTITLEEFDK	150	2	41	Kombinirana uzvojnica i β -ploča	Antifungalno	[131]
Mitimicin	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MGYIGLCGVLLSLSLLMLLQIPTSDA NVLGDCWEDWSRCTRQTNWFTNI AWQSCP NRCKCQGHAGGNICQVR SNCFLWRNKRWMCNCYGRSGPK PGWCGF	101	7	43	Kombinirana uzvojnica i β -ploča	Gram+ i Gram-	[139]
Veliki defensin	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MNRKAILCVLYATLLIIPAPILGRVV AKKKEEKRYAAVYPIAAYAGMTVS LPVFLALVAAYGAWTVARYHIRSRS RSSSHNSHNCANNRGWCRPNCFRR EYHDWYHSDTCGSYKCCRYR	119	14	42	Kombinirana uzvojnica i β -ploča	Gram+ i Gram-	[134]
Myticusin-1	<i>Mytilus coruscus</i>	TDHQMAQSACIGVSQDNAYASAIP RDCHGGKTCEGICADATATMDRYS DTGGPLSIARCVNAHFYKRRGEEN VSYKPFVVS WKYGVAGCFYTHCGP NFCCIS	104	0	39	Kombinirana uzvojnica i β -ploča	Gram+ i Gram-, Antifungalno	[132]
VpBD	<i>Venerupis philippinaram</i>	LCLDQKPEMEPFRKDAQQALEPSRQ RRWLHRRCLSGRGFCRAICSI FEEP V RGNIDCYFGYNCCRRMF SHYRTS	74	5	36	Uzvojnica	Gram+ i Gram-	[135]
MCdef	<i>Ruditapes philippinaram</i>	GFGCPNDYSCSNHCRDSIGCRGGYC KYQLICTCYGCKRRRSIQE	44	4	29	Kombinirana uzvojnica i β -ploča	Gram+ i Gram-	[136]
VpDef	<i>Venerupis philippinaram</i>	GFGCPEDEYECHNHCKNSVGCRRGG YCDAGTLRQRCTCYGCNQKGRSIQE	49	0	26	Kombinirana uzvojnica i β -ploča	Gram+ i Gram-	[137]
Sb-BDef1	<i>Scapharca broughtoni</i>	MTHKIVLCCIIYLLSTSFILSKHLP EE RKQKKQVLLAAGAGVALSELLGPV LVGAGTLAGAALLNQAVSSNRWVI PCANNRGWCRTDCHFGHEIDDYHS DICHSGYKCCRY	111	3	45	Kombinirana uzvojnica i β -ploča	Gram -	[138]
Ap	<i>Argopecten purpuratus</i>	TYMPVEEGEYIVNISYADQPKKNSPF TAKKQPGPKVDLSGVKAYGPG	47	1	25	Bogat poliprolinom i β -ploča	Gram+ i antifungalno	[139]
AiBD	<i>Argopecten irradians</i>	MTRPSLVRCYSLFFTALIVMAIICPA WSEEIPKSRKKRAPIAYVGMAVAP QVFRWLVRAYGAAAVTAAGVTLRR VINRSRSDNHSCYGNRGWCRSSCR SYEREYRGGNLGVCGSYKCCVT	122	14	44	Kombinirana uzvojnica i β -ploča	Gram+ i Gram-, Antifungalno	[140]
AOD	<i>Crassostrea virginica</i>	GFGCPWNR YQCHSHCRSIGRLGGY CAGSLRLTCTCYRS	38	5	34	Kombinirana uzvojnica i β -ploča	Gram+ i Gram-	[141]
Cg-Pro	<i>Crassostrea gigas</i>	ILENLLARSTNEDREGSIFDTGPIRRPK PRPRPREG	37	2	21	Prolinom bogat peptid	Sinergijska Antimikrobna aktivnost sa Cg-Def	[142]
cgMolluscidin	<i>Crassostrea gigas</i>	AATAKKGAKKADAPAKPKKATKP KSPKKA AKKAGAKKGVKRAGKKG AKKTTKAKK	55	23	29	Uzvojnica	Gram+ i Gram-	[141]
Cg-Defh1	<i>Crassostrea gigas</i>	GFGCPRDQYKCNSHCQSIGCRAGY CDAVTLWLRTCTDCNGKK	43	3	37	Kombinirana uzvojnica i β -ploča	Gram+ i Gram-	[143]
Cg-Defh2	<i>Crassostrea gigas</i>	GFGCPGDQYECNRHCRSIGCRAGY CDAVTLWLRTCTGCSGKK	44	3	37	Kombinirana uzvojnica i β -ploča	Gram+ i Gram-	[144]

2.3. Antimikrobni peptidi u medicini

U zadnjim desetljećima, bakterije su razvile rezistenciju na skoro sve postojeće klase antibiotika. Meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) je identificiran svega dvije godine nakon uvođenja meticilina u uporabu 1960. godine [145], a u posljednje vrijeme primijećeni su i slučajevi rezistencije na kolistin – antibiotik koji se koristi kao posljednje sredstvo obrane protiv Gram-negativnih bakterija [6]. Danas, više nego ikad prije javlja se potreba za razvitkom novih klasa antibiotika koji imaju sposobnost djelovanja naspram „superbakterija“. Kao moguća alternativa, zbog multimodalnog načina djelovanja, nameću se antimikrobni peptidi – biomakromolekule na koje bakterije teško razvijaju rezistenciju.

2.3.1. Prednosti nad klasičnim antibioticima

Za razliku od antibiotika, koji djeluju na specifične stanične aktivnosti (na primjer sintezu DNA ili proteina) [1], antimikrobni peptidi imaju širok spektar djelovanja na Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije (uključujući i multirezistentne sojeve), ali i druge vrste mikroorganizama (Tablica 6). Također, djeluju izrazito brzo, a često mogu djelovati i na nekoliko bakterijskih stanica [61]. Njihova aktivnost nije spriječena mehanizmima rezistencije bakterija koji inhibiraju djelovanje antibiotika, a odličan primjer toga je djelovanje peptida protiv meticilin-rezistentne *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* [146].

S obzirom na prisutnost AMP-a u skoro svim organizmima evidentna je njihova evolucijska starost, pa se postavlja pitanje kako to da bakterije nisu uspjele razvit razvile efektivan sustav rezistencije. S obzirom da je meta AMP-a bakterijska membrana, mikrob bi trebao redizajnirati membranu, mijenjajući sastav i organizaciju lipida što predstavlja veliki utrošak energije za stanicu. S druge strane, antimikrobne peptide je relativno teško uništiti. Naime većina peptida je građena od nedefiniranih aminokiselinskih ostataka koji nemaju jedinstvene epitope koje bi proteaze koje luče mikrobi mogli prepoznati. Također mnogostanični organizmi napadaju mikrobe tako što luče "koktel" antimikrobnih peptida različitih struktura, stoga uništenje samo jednog peptida ne bi bilo dovoljno za preživljavanje bakterije [21].

Glavni razlog i motivacija za istraživanje AMP-a je njihov potencijal za raznoliku primjenu te širok spektar meta protiv kojih djeluju. Pa tako antimikrobni peptidi mogu biti korišteni kao antimikrobni agensi, zatim u kombinaciji s različitim antibioticima gdje djeluju sinergijski, kao komponente koje reguliraju imunološki odgovor i kao tvari koje neutraliziraju endotoksine [21].

Tablica 6. Usporedba djelovanja antibiotika i antimikrobnih peptida [10]

Svojstvo	Uobičajeni antibiotici	Antimikrobni peptidi
Spektar aktivnosti	Bakterijske infekcije (često selektivni)	Bakterijske, gljivične i virusne infekcije
Djelovanje	Specifični mehanizmi	Relativno nespecifični, bazirano na naboju
Mete	Obično jedna meta ili skup meta	Relativno manje specifične, moguće više meta u svim stanicama
Stopa rezistencije i mehanizam	Razvoj otpora varira od 10^{-7} do 10^{-10} . Rezistencija može biti stvorena mehanizmima poput reduciranog unosa ili prekomjernog izbacivanja, kemijske modifikacije ili degradacija antibiotika, promjena meta	Generalno rezistencija ne može biti direktno stvorena. Potrebno je nekoliko puta iterativno tretirati bakterije pri koncentracijama ispod MIC kako bi izazvali rezistenciju. Rezistencija može biti izazvana promjenama u sastavu vanjske membrane i aktiviranjem proteaza.
Dodatne aktivnosti	Ne	Djeluje anti endotoksično i pojačava imunološki odgovor urođenog sustava
Farmakokinetika	Varira, ali jednom tjedno za lijekove pod istraživanjem	Kratko sistemsko vrijeme poluživota zbog proteolitičke aktivnosti
Toksikologija	Antibiotici su jedni od najsigurnijih lijekova	Dosad nepoznate lokalne toksičnosti, endotoksičnost i dalje nedefinirana
Trošak proizvodnje	Može biti skup	Skup, 50 – 400 dolara po gramu

2.3.2. Prepreke terapijskoj primjeni

Zasigurno, jedan od najvećih problema u komercijalizaciji AMP-a kao terapeutika je visoka cijena proizvodnje (Tablica 6). Unatoč tome što je *in vitro* aktivnost peptida često izvrsna, u fiziološkim uvjetima može znatno opasti kao posljedica preosjetljivosti na velike koncentracije soli [10]. Također, izuzetno važna stavka je stabilnost peptida prilikom *in vivo* primjene. Dosadašnja istraživanja su pokazala da su peptidi podložni proteolitičkoj degradaciji od strane proteaza koje se nalaze u serumu ili plazmi, te se veliki naponi posvećuju re-dizajnu peptida kako bi se minimalizirao taj učinak [147].

Također, AMP često mogu biti toksični naspram ljudskih stanica tako da direktno djeluju na stanice (npr. Melitin [148]) ili izazvaju određene upalne reakcije [116]. Npr. višak katelicidina

u obliku LL37 potiče upalu kože i abnormalni rast krvnih žila u osoba koje boluju od rosacee. Nedavne kliničke studije su pokazale povezanost ekspresije određenih antimikrobnih peptida s patogeneom pojedinih bolesti (Tablica 8) [149].

Tablica 7. Povezanost ekspresije određenih antimikrobnih peptida s patogeneom pojedinih bolesti [150].

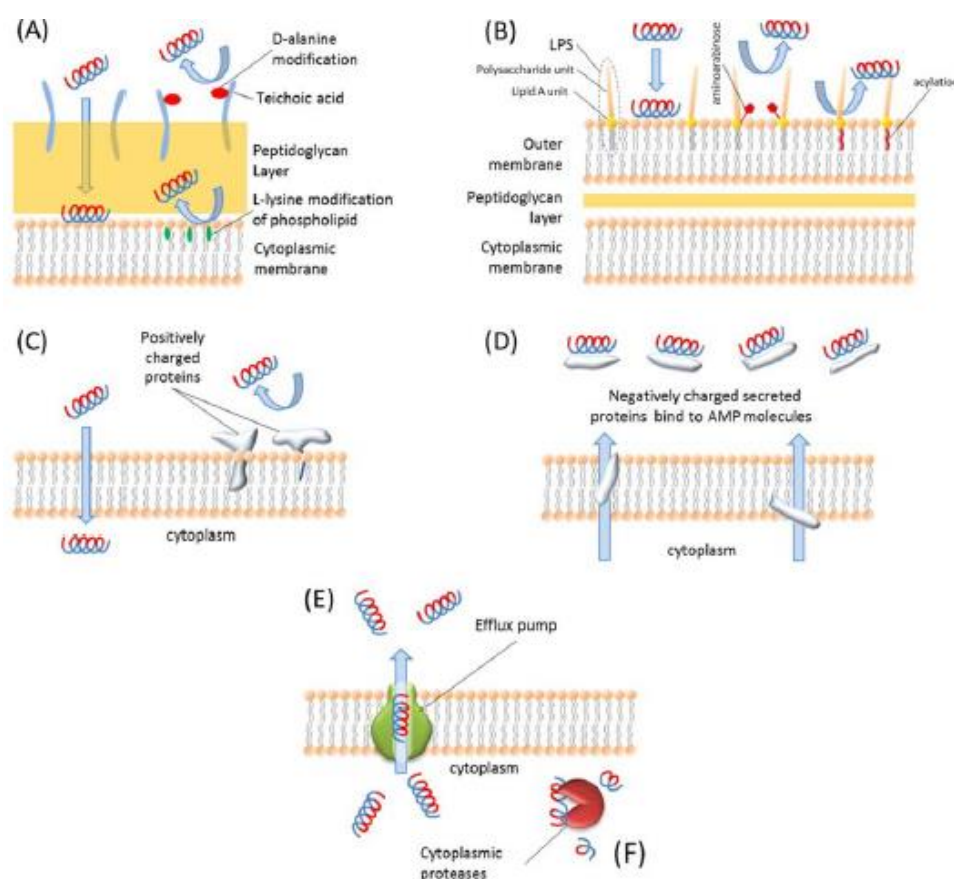
Bolesti	Peptidi	Nivo ekspresije	Reference
Bolesti kože			
Atopijski dermatitis	LL37, defensini	Snižen	[151]
Psorijaza	LL37, defensini	Prekomjeran	[151]
Rosacea	Katelicidini	Povećan	[149]
Akne	Defensini, granulizin	Povećan	[152,153]
Lupus i kontaktni dermatitis	LL37	Povećan	[154]
Bolesti crijeva			
Ulcerozni kolitis	HD5,6,hBD2-4; lizosom	Povećan	[155]
Crohnova bolest	α -defensini, hBD2	Reduciran u Panethovim stanicama, mali broj kopija gena hBD2	[156,157]
Gastrointestinalne infekcije	LL37, hBD1	Snižen	[157]
Dišne bolesti			
Cistična fibroza	LL37, β -defensini	Reducirana antimikrobna aktivnost zbog akumulacije soli	[158]

2.3.3. Rezistencija bakterija na antimikrobne peptide

Iako je mala vjerojatnost razvijanja bakterijske rezistencije na antimikrobne peptide, neke bakterije su u tome uspjele. Vrste iz roda *Shigella* (*S.dysenteriae*, *S.flexneri*, *S.boydii* i *S.sonnei*) izlučuju plazmidnu DNA kako bi zaustavili ekspresiju antimikrobnih peptida u epitelnim stanicama i monocitima [159], što pomaže bakterijama da izbjegnu djelovanje antimikrobnih peptida. Druga strategija rezistencije bakterija je ta da enzimatskim aktivnostima inaktiviraju djelovanje antimikrobnih peptida. *Staphylococcus aureus* i *Porphyromonas gingivalis* su primjeri bakterija koje luče proteaze kako bi inaktivirali antimikrobne peptide (Slika 6). Još jedna efektivna strategija korištena od strane mikroba je mijenjanje sastava vanjske membrane. *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* kontroliraju tri komponente peptidnog senzorskog sustava kako bi regulirale sintezu L-lizina i D-alanina. Oni mijenjaju lipidni

fosfatidilglicerol s lizinom i dodaju D-alanin u teikoičnu kiselinu, a posljedica toga je smanjenje negativnog naboja na površini bakterijske membrane i odbijanje kationskih antimikrobnih peptida (Slika 6) [160, 161-163].

Slično Gram-pozitivnim bakterijama u određenim okolnostima, Gram-negativne bakterije također kontroliraju njihove dvije komponente signalnog staničnog sistema, PhoP-PhoQ i PmrA-PmrB kako bi modificirale njihov lipopolisaharidni sloj [164]. *Salmonella enterica* Typhimurium može formirati hepta-acilirani lipid A dodavanjem palmitata preko proteina PagP, zatim može dodati fosfat i fosfoetanolamin u koru polisaharida i modificirati fosfatne grupe lipida A s etanolaminom i aminoarabinozom [150].



Slika 6. Shematski prikaz mehanizama rezistencije protiv antimikrobnih peptida. A) Gram pozitivne bakterije modificiraju teikoičnu kiselinu i fosfolipide. B) Gram negativne bakterije modificiraju lipopolisaharidne molekule arabinozom ili acilacijom lipid A jedinice u lipopolisaharidu. C) Bakterija izlučuje pozitivno nabijene proteine i integrira ih u membranu. D) Bakterija luči negativno nabijene proteine u izvanstanični prostor gdje se oni vežu za peptide ili ih blokiraju. E) Antimikrobni peptidi bivaju izbačeni iz stanice pomoću efluks pumpi. F) Antimikrobni peptidi bivaju degradirani proteazama.[1]

3. SAŽETAK

Antimikrobni peptidi su peptidi s različitim brojem aminokiselina i širokim spektrom djelovanja na viruse, bakterije, gljive i parazite. S obzirom da se u zadnjim desetljećima broj bakterija otpornih na dosad poznate antibiotike naglo povećao, stvorila se potreba za efikasnim terapeutcima. Kao potencijalni kandidati za rješenje ovog problema nameću se antimikrobni peptidi. Njihova strukturalna različitost i multimodalni način djelovanja, koji uključuje narušavanje integriteta membrane i/ili inhibiranje sinteze DNA i proteina unutar stanice, omogućuje im djelovanje na široki spektar bakterija s malom naznakom razvoja rezistencije.

S obzirom da morski školjkaši spadaju u skupinu filtratora, to jest hrane se na način da filtriraju morsku vodu za koju se smatra da je neograničen izvor patogena, postoji vrlo velika vjerojatnost nakupljanja velika količine mikroba u tkivima školjkaša. Osim fagocitoze uz pomoć hemocita, veliku važnost u imunološkom odgovoru školjkaša protiv mikroba imaju antimikrobni peptidi. Antimikrobni peptidi iz školjkaša su uglavnom cisteinom bogati i disulfidnim mostovima stabilizirani peptidi i podijeljeni su u 6 skupina: veliki defensini, defensini, mitlini, miticini, mitimicini, mitimacini. Proučavanje AMP-a iz školjkaša je bitno iz evolucijske perspektive te njihovog biomedicinskog potencijala.

Unatoč poželjnim karakteristikama dosad otkrivenih AMP-a, njihov terapijski potencijal još nije u potpunosti zaživio prvenstveno zbog preskupih troškova proizvodnje, često visoke toksičnosti po stanice čovjeka te velikoj nestabilnosti u *in vivo* uvjetima.

4. LITERATURA

1. Bahar, A.A.; Dacheng, R; Antimicrobial Peptides, **2013**, ISSN, 1424-8247.
2. Nijnik, A.; Hancock, R. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerg. Health Threats J.* **2009**, 2
3. Cederlund, A.; Gudmundsson, G.H.; Agerberth, B.: Antimicrobial peptides important in innate immunity: Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS J.*, **2011**, 278, 3942-3951.
4. Roca, I., Akova, M.; Baquero, F.; Carlet, J.; Cavaleri, M.; Coenen, S.; Cohen, J.; Findlay, D.; Gyssens, I.; Heure, O.E.; et al.: The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New microbes New Infect* **2015**, 6, 22-29.
5. Alains, A.J.: Resistance to Antibiotics: Are We in the Post Antibiotic Era? *Arch Med. Res.* **2005**, 36, 697-705.
6. Liu, Y.-Y.; Wang, Y.; Walsh, T.R., Yi, L.-X., Zhang, R.; Spencer, J.; Doi, Y.; Tian, G.; Dong, B.; Huang, X. et al.: Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, 16, 161-168.
7. Lim, L.M.; Lyn, N.; Anderson, D.; Yang,.; Macander, L.; Jarkowski, A.; Forrest, A.; Bulitta, J.B.; Tsuji, B.T.: Resurgence of Colistin: A review of Resistance, Toxicity, Pharmacodynamics, and Dosing. *Pharmacotherapy* **2010**, 30, 1279-1291.
8. Zanella, C.; Mosca, F.; Mariani, F.; Franci, G.; Folliero, V.; Galdiero, M.; Tiscar, P.G.; Galdiero, M. Microbial diseases of Bivalve mollusks: Infections, Immunology and Antimicrobial Defense. 2017
9. Tincu, J.A.; Taylor, S.W. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**; 48:3645-54.
10. Marr, K.A.; Gooderham, W.J.; Hancock, E.W.R. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current opinion in Pharmacology* **2006**, 6:468-472.
11. Zhao, X.; Wu, H.; Lu, H.; Li, G.; Huang, Q. Lamp: A database linking antimicrobial peptides *PLoS One* **2013**, 8, e66557

12. Van Epps, H.L. Rene dubos: Unearthing antibiotics. *J. Exp. Med.* **2006**, 203, 259.
13. Dubos, R.J. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: I. Preparation of the agent. Its activity *in vitro*. *J. Exp. Med.* **1939**, 70, 1-10.
14. Dubos, R.J. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil *Bacillus*: II. Protective effect of the bactericidal agent against experimental *Pneumococcus* infections in mice. *J. Exp. Med.* **1939**, 70, 11-17.
15. Hotchkiss, R.D.; Dubos, R.J. Fractionation of the bactericidal agent from cultures of a soil *Bacillus*. *J. Biol. Chem.* **1940**, 132, 791-792.
16. Dubos, R.J.; Hotchkiss, R.D. The production of bactericidal substances by aerobic sporulating bacilli. *J. Exp. Med.* **1941**, 73, 629-640.
17. Rammelkamp, C.H.; Weinstein, L. Toxic effects of tyrothricin, gramicidin and tyrocidine. *J. Infect. Dis.* **1942**, 71, 166-173.
18. Ohtani, S.; Okada, T.; Yoshizumi, H.; Kagamiyama, H. Complete primary structures of two subunits of purothionin a, a lethal protein for brewer's yeast from wheat flour. *J. Biochem.* **1977**, 82, 753-767.
19. Hirsch, J.G.; Phagocytin: A bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* **1956**, 103, 589-611.
20. Zeya, H.I.; Spitznagel, J.K. Antibacterial and enzymic basic proteins from leukocyte lysosomes: Separation and identification. *Science* **1963**, 142, 1085-1087.
21. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **2002**, 415, 389-395.
22. Schaubert, J.; Gallo, R.L. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2008**, 122, 261-266.
23. Radek, K.; Gallo, R. Antimicrobial peptides: Natural effectors of the innate immune system. *Semin. Immunopathol.* **2007**, 29, 27-43.
24. Conlon, J.M.; Sonnevend, A. Antimicrobial peptide sin frog skin secretions. *Methods Mol. Biol.* **2010**, 618, 3-14.

25. Ma, Y.F.; Liu, C.B.; Liu, X.H.; Wu, J.; Yang, H.L.; Wang, Y.P.; Li, J.X.; Yu, H.N.; Lai, R. Peptidomics and genomics analysis of novel antimicrobial peptides from the frog, *Rana nigrovittata*. *Genomics* **2010**, *95*, 66-71.
26. Ganz, T. The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integr. Comp. Biol.* **2003**, *43*, 300-304.
27. Niyonsaba, F.; Iwabuchi, K.; Matsuda, H.; Ogawa, H.; Nagaoka, I. Epithelial cell-derived human beta-defensin 2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase c-dependent pathway. *Int. Immunol.* **2002**, *14*, 421-426.
28. Hancock, R.E.; Scott, M.G. The role of antimicrobial peptide sin animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8856-8861.
29. Loppnow, H.; Libby, P.; Freudenberg, M.; Krauss, J.H.; Weckesser, J.; Mayer, H. Cytokine induction by lipopolysaccharide corresponds to lethal toxicity and is inhibited by nontoxic *Rhodobacter capsulatus* LPS. *Infect. Immun.* **1990**, *58*, 3743-3750.
30. Boman, H.G. Innate immunity and the normal microflora. *Immunol. Rev.* **2000**, *173*, 5-16.
31. Powers, J.P.; Hancock, R.E: The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* **2003**, *24*, 1681-1691.
32. Huang, Y.B.; Huang, J.F.; Chen, Y.X. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and fuction. *Protein Cell* **2010**, *1*, 143-152.
33. McManus, A.M.; Dawson, N.F.; Wade, J.D.; Carrington, L.E.; Winzor, D.J.; Craik, D.J. Three dimensional structure of rk-1: A novel alpha-defensin peptide. *Biochemistry* **2000**, *39*, 15757-15764.
34. Uteng, M.; Hauge, H.H.; Markwick, P.R.; Fimland, G.; Mantzilas, D.; Nissen-Meyer, J.; Muhle-Goll, C. Three dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin p and a sakacin p variant that is structurally stabilized by an inserted c-terminal disulfide bridge. *Biochemistry* **2003**, *42*, 11417-11426.
35. Rozek, A.; Friedrich, C.L.; Hancock, R.E. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry* **2000**, *39*, 15765-15774.

36. Loeffler, J.M.; Nelson, D.; Fischetti, V.A. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* **2001**, *294*, 2170–2172.
37. Costa, F.; Carvalho, I.F.; Montelaro, R.C.; Gomes, P.; Martins, M.C. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 1431–1440.
38. Wade, J.D.; Lin, F.; Hossain, M.A.; Dawson, R.M. Chemical synthesis and biological evaluation of an antimicrobial peptide gonococcal growth inhibitor. *Amino Acids* **2012**, *43*, 2279–2283.
39. Piers, K.L.; Brown, M.H.; Hancock, R.E. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene* **1993**, *134*, 7–13.
40. Ramos, R.; Moreira, S.; Rodrigues, A.; Gama, M.; Domingues, L. Recombinant expression and purification of the antimicrobial peptide magainin-2. *Biotechnol. Prog.* **2013**, *29*, 17–22.
41. Tossi, A.; Sandri, L.; Giangaspero, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **2000**, *55*, 4–30.
42. Westerhoff, H.V.; Juretic, D.; Hendler, R.W.; Zasloff, M. Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 6597–6601.
43. Subbalakshmi, C.; Nagaraj, R.; Sitaram, N.: Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity. *FEBS Lett.* **1999**, *448*, 62–66.
44. Oren, Z.; Shai, Y. A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *237*, 303–310.
45. Lee, D.G.; Kim, H.N.; Park, Y.K.; Kim, H.K.; Choi, B.H.; Choi, C.H.; Hahm, K.S. Design of novel analogue peptides with potent antibiotic activity based on the antimicrobial peptide, hp (2–20), derived from n-terminus of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1598*, 185–194.
46. Chen, L.; Harrison, S.D.: Cell-penetrating peptide in drug development: enabling intracellular targets. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 821–825.

47. Kustanovich, I.; Shalev, D.E.; Mikhlin, M.; Gaidukov, L.; Mor, A. Structural requirements for potent versus selective cytotoxicity for antimicrobial dermaseptin s4 derivatives. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 16941–16951.
48. Zelezetsky, I.; Pacor, S.; Pag, U.; Papo, N.; Shai, Y.; Sahl, H.G.; Tossi, A. Controlled alteration of the shape and conformational stability of alpha-helical cell-lytic peptides: Effect on mode of action and cell specificity. *Biochem. J.* **2005**, 390, 177–188.
49. Dathe, M.; Wieprecht, T.; Nikolenko, H.; Handel, L.; Maloy, W.L.; MacDonald, D.L.; Beyermann, M.; Bienert, M. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett.* **1997**, 403, 208–212.
50. Fernandez-Vidal, M.; Jayasinghe, S.; Ladokhin, A.S.; White, S.H. Folding amphipathic helices into membranes: Amphiphilicity trumps hydrophobicity. *J. Mol. Biol.* **2007**, 370, 459–470.
51. Kalenić S. Mikoplazme. U: Kalenić S, Mlinarić-Missoni S i sur. ur. Medicinska bakteriologija i mikologija 2. izd. Zagreb: Merkur ABD; **2001**, 315-9
52. Robinson, W.E., Jr.; McDougall, B.; Tran, D.; Selsted, M.E. Anti-hiv-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **1998**, 63, 94–100.
53. Belaid, A.; Aouni, M.; Khelifa, R.; Trabelsi, A.; Jemmali, M.; Hani, K. In vitro antiviral activity of dermaseptins against *herpes simplex virus* type 1. *J. Med. Virol.* **2002**, 66, 229–234.
54. Tamamura, H.; Ishihara, T.; Otake, A.; Murakami, T.; Ibuka, T.; Waki, M.; Matsumoto, A.; Yamamoto, N.; Fujii, N. Analysis of the interaction of an anti-hiv peptide, t22 ([tyr5, 12, lys7]- polyphemusin ii), with gp120 and cd4 by surface plasmon resonance. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1298, 37–44.
55. Song, B.H.; Lee, G.C.; Moon, M.S.; Cho, Y.H.; Lee, C.H. Human cytomegalovirus binding to heparan sulfate proteoglycans on the cell surface and/or entry stimulates the expression of human leukocyte antigen class I. *J. Gen. Virol.* 2001, 82, 2405–2413.
56. WuDunn, D.; Spear, P.G. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* 1989, 63, 52–58.

57. Horne S.W.; Wiethoff, M.C.; Cui, C.; Wilcoxon, M.K.; Amorin, M.; Ghadiri, R.M.; Nemerow, G.R.: Antiviral cyclic D,L- α -peptides: Targeting a general biochemical pathway in virus infections. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, 13, 5145-5153.
58. Shai, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 2002, 66, 236–248.
59. Zhang, L.; Rozek, A.; Hancock, R.E. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 35714–35722.
60. Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R.E.W. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, 19, 491–511.
61. Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3, 238–250.
62. Lehrer, R.I.; Szklarek, D.; Ganz, T.; Selsted, M.E.: Correlation of binding of rabbit granulocyte peptides to *Candida albicans* with candidacidal activity. *Infect. Immun.* **1985**, 49, 207-211.
63. Van der Weerden, N.L.; Hancock, R.E.; Anderson, M.A. Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin nad1 occurs through a cell wall-dependent process. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 37513–37520.
64. Moerman, L.; Bosteels, S.; Noppe, W.; Willems, J.; Clynen, E.; Schoofs, L.; Thevissen, K.; Tytgat, J.; Van Eldere, J.; van der Walt, J.; et al. Antibacterial and antifungal properties of α -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 4799–4810.
65. Zasloff, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84, 5449–5453.
66. Pouny, Y.; Rapaport, D.; Mor, A.; Nicolas, P.; Shai, Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* **1992**, 31, 12416–12423.
67. Bechinger, B. Detergent-like properties of magainin antibiotic peptides: A 31p solid-state nmr spectroscopy study. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1712, 101–108.

- 68 . Bolintineanu, D.S.; Kaznessis, Y.N. Computational studies of protegrin antimicrobial peptides: A review. *Peptides* **2011**, *32*, 188–201.
69. Mecke, A.; Lee, D.K.; Ramamoorthy, A.; Orr, B.G.; Holl, M.M.B. Membrane thinning due to antimicrobial peptide binding: An atomic force microscopy study of msi-78 in lipid bilayers. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 4043–4050.
70. Ludtke, S.; He, K.; Huang, H. Membrane thinning caused by magainin 2. *Biochemistry* **1995**, *34*, 16764–16769.
71. Chen, F.Y.; Lee, M.T.; Huang, H.W. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 3751–3758.
72. Wu, M.; Maier, E.; Benz, R.; Hancock, R.E. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **1999**, *38*, 7235–7242.
73. Ehrenstein, G.; Lecar, H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q. Rev. Biophys.* **1977**, *10*, 1–34.
74. Shimazaki, K.; Tazume, T.; Uji, K.; Tanaka, M.; Kumura, H.; Mikawa, K.; Shimo-Oka, T. Properties of a heparin-binding peptide derived from bovine lactoferrin. *J. Dairy. Sci.* **1998**, *81*, 2841–2849.
75. Hiromi, S.; Feix, J.B.: Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipatic α -helical antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* **1758**, **2006**, 1245-1256.
76. Zhang, Y.M.; Rock, C.O. Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, S115–S119.
77. Nicolas, P. Multifunctional host defense peptides: Intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS J.* **2009**, *276*, 6483–6496.
78. Hilpert, K.; McLeod, B.; Yu, J.; Elliott, M.R.; Rautenbach, M.; Ruden, S.; Burck, J.; Muhle-Goll, C.; Ulrich, A.S.; Keller, S. et al. Short cationic antimicrobial peptides interact with ATP. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 4480–4483.

79. Chitnis, S.N.; Prasad, K.S.; Bhargava, P.M. Isolation and characterization of autolysis-defective mutants of *Escherichia coli* that are resistant to the lytic activity of seminalplasmin. *J. Gen. Microbiol.* **1990**, 136, 463–469.
80. Chitnis, S.N.; Prasad, K.S.; Bhargava, P.M. Bacteriolytic activity of seminalplasmin. *J. Gen. Microbiol.* **1987**, 133, 1265–1271.
81. Madani, F.; Lindberg, S.; Langel, U.; Futaki, S.; Graslund, A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J. Biophys.* **2011**, 2011, 414729.
82. Jones, A.T. Macropinocytosis: Searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J. Cell Mol. Med.* **2007**, 11, 670–684.
83. Suffredini, E.; Lanni, L.; Arcangeli, G.; Pepe, T.; Mazzette, R.; Ciccaglioni, G.; Croci, L. Qualitative and quantitative assessment of viral contamination in bivalve molluscs harvested in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, 184, 21–26.
84. Farley, C.A.; Banfield, W.G.; Kasnic, G., Jr.; Foster, W.S. *Oyster herpes-type virus*. *Science* **1972**, 178, 759–760.
85. Bai, C.; Gao, W.; Wang, C.; Yu, T.; Zhang, T.; Qiu, Z.; Wang, Q.; Huang, J. Identification and characterization of ostreid herpesvirus 1 associated with massive mortalities of *Scapharca broughtonii* broodstocks in China. *Dis. Aquat. Organ.* **2016**, 118, 65–75.
86. Lynch, S.A.; Carlsson, J.; Reilly, A.O.; Cotter, E.; Culloty, S.C. A previously undescribed *Ostreid Herpes Virus 1* (OsHV-1) genotype detected in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. *Parasitology* **2012**, 139, 1526–1532.
87. Bai, C.; Wang, C.; Xia, J.; Sun, H.; Zhang, S.; Huang, J. Emerging and endemic types of *Ostreid herpesvirus 1* were detected in bivalves in China. *J. Invertebr. Pathol.* **2015**, 124, 98–106.
88. Arzul, I.; Corbeil, S.; Morga, B.; Renault, T. Viruses infecting marine molluscs. *J. Invertebr. Pathol.* **2017**.
89. Bidault, A.; Richard, G.G.; le Bris, C.; Paillard, C. Development of a Taqman real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio tapetis* in extrapallial fluids of clams. *PeerJ* **2015**, 3, e1484.

90. Ford, S.E. Roseovarius Oyster Disease (ROD) Caused by *Roseovarius crassostreae*; ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish; ICES: Copenhagen, Denmark, **2011**.
91. Friedman, C.S.; Beattie, J.H.; Elston, R.A.; Hedrick, R.P. Investigation of the relationship between the presence of a Gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Aquaculture* 1991, 94, 1–15.
92. Gomez-Leon, J.; Villamil, L.; Lemos, M.L.; Novoa, B.; Figueras, A. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, 71, 98–104.
93. Froelich, B.A.; Noble, R.T. *Vibrio* bacteria in raw oysters: Managing risks to human health. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2016**, 371.
94. Paillard, C.; Korsnes, K.; Le Chevalier, P.; Le Boulay, C.; Harketstad, L.; Eriksen, A.G.; Willassen, E.; Bergh, O.; Bovo, C.; Skar, C.; et al. *Vibrio tapetis*-like strain isolated from introduced Manila clams *Ruditapes philippinarum* showing symptoms of brown ring disease in Norway. *Dis. Aquat. Organ.* **2008**, 81, 153–161.
95. Park, K.I.; Yang, H.S.; Kang, H.S.; Cho, M.; Park, K.J.; Choi, K.S. Isolation and identification of *Perkinsus olseni* from feces and marine sediment using immunological and molecular techniques. *J. Invertebr. Pathol.* **2010**, 105, 261–269.
96. Ford, S.E.; Borrero, F.J. Epizootiology and pathology of juvenile oyster disease in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* **2001**, 78, 141–154.
97. Friedman, C.S.; Cloney, D.F.; Manzer, D.; Hedrick, R.P. Haplosporidiosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* **1991**, 58, 367–372.
98. Carella, F.; Carrasco, N.; Andree, K.B.; Lacuesta, B.; Furones, D.; De Vico, G. Nocardiosis in Mediterranean bivalves: First detection of *Nocardia crassostreae* in a new host *Mytilus galloprovincialis* and in *Ostrea edulis* from the Gulf of Naples (Italy). *J. Invertebr. Pathol.* **2013**, 114, 324–328.

99. Queiroga, F.R.; Marques-Santos, L.F.; De Medeiros, I.A.; Da Silva, P.M. Effects of salinity and temperature on *in vitro* cell cycle and proliferation of *Perkinsus marinus* from Brazil. *Parasitology* 2016, 143, 475–487.
100. Fernandez Robledo, J.A.; Vasta, G.R.; Record, N.R. Protozoan parasites of bivalve molluscs: Literature follows culture. *PLoS ONE* **2014**, 9, e100872.
101. Smolowitz, R. A review of current state of knowledge concerning *Perkinsus marinus* effects on *Crassostrea virginica* (Gmelin) (the eastern oyster). *Vet. Pathol.* **2013**, 50, 404–411.
102. Carnegie, R.B.; Meyer, G.R.; Blackbourn, J.; Cochenec-Laureau, N.; Berthe, F.C.; Bower, S.M. Molecular detection of the oyster parasite *Mikrocytos mackini*, and a preliminary phylogenetic analysis. *Dis. Aquat. Organ.* **2003**, 54, 219–227.
103. Feng, C.; Lin, X.; Wang, F.; Zhang, Y.; Lv, J.; Wang, C.; Deng, J.; Mei, L.; Wu, S.; Li, H. Detection and characterization of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* imported to China. *Dis. Aquat. Organ.* **2013**, 106, 85–91.
104. Lane, H.S.; Webb, S.C.; Duncan, J. *Bonamia ostreae* in the New Zealand oyster *Ostrea chilensis*: A new host and geographic record for this haplosporidian parasite. *Dis. Aquat. Organ.* **2016**, 118, 55–63.
105. Corbeil, S.; Arzul, I.; Robert, M.; Berthe, F.C.; Besnard-Cochennec, N.; Crane, M.S. Molecular characterisation of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. *Dis. Aquat. Organ.* **2006**, 71, 81–85.
106. Hill, K.M.; Stokes, N.A.; Webb, S.C.; Hine, P.M.; Kroeck, M.A.; Moore, J.D.; Morley, M.S.; Reece, K.S.; Burrenson, E.M.; Carnegie, R.B. Phylogenetics of *Bonamia* parasites based on small subunit and internal transcribed spacer region ribosomal DNA sequence data. *Dis. Aquat. Organ.* **2014**, 110, 33–54.
107. Narcisi, V.; Arzul, I.; Cargini, D.; Mosca, F.; Calzetta, A.; Traversa, D.; Robert, M.; Joly, J.P.; Chollet, B.; Renault, T.; et al. Detection of *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* (*Haplosporidia*) in *Ostrea edulis* from the Adriatic Sea (Italy). *Dis. Aquat. Organ.* **2010**, 89, 79–85.

108. Carnegie, R.B.; Hill, K.M.; Stokes, N.A.; Burrenson, E.M. The haplosporidian *Bonamia exitiosa* is present in Australia, but the identity of the parasite described as *Bonamia* (formerly *Mikrocytos*) roughleyi is uncertain. J. Invertebr. Pathol. **2014**, 115, 33–40.
109. Carnegie, R.B.; Burrenson, E.M.; Hine, P.M.; Stokes, N.A.; Audemard, C.; Bishop, M.J.; Peterson, C.H. *Bonamia perspora* n. sp. (Haplosporidia), a parasite of the oyster *Ostreola equestris*, is the first *Bonamia* species known to produce spores. J. Eukaryot. Microbiol. **2006**, 53, 232–245.
110. Lynch, S.A.; Armitage, D.V.; Coughlan, J.; Mulcahy, M.F.; Culloty, S.C. Investigating the possible role of benthic macroinvertebrates and zooplankton in the life cycle of the haplosporidian *Bonamia ostreae*. Exp. Parasitol. **2007**, 115, 359–368.
111. Cochenne-Laureau, N.; Auffret, M.; Renault, T.; Langlade, A. Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. J. Invertebr. Pathol. **2003**, 83, 23–30.
112. Kleeman, S.N.; Adlard, R.D. Molecular detection of *Marteilia sydneyi*, pathogen of Sydney rock oysters. Dis. Aquat. Organ. **2000**, 40, 137–146.
113. Schneider, O.; Sereti, V.; Machiels, M.A.; Eding, E.H.; Verreth, J.A. The potential of producing heterotrophic bacteria biomass on aquaculture waste. Water Res. **2006**, 40, 2684–2694.
114. Gombac, M.; Kusar, D.; Ocepek, M.; Pogacnik, M.; Arzul, I.; Couraleau, Y.; Jencic, V. Marteilirosis in mussels: A rare disease? J. Fish Dis. **2014**, 37, 805–814.
115. Rubio, A.; Frances, J.; Coad, P.; Stubbs, J.; Guise, K. The onset and termination of the Qx disease window of infection in Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) cultivated in the Hawkesbury River, NSW, Australia. J. Shellfish Res. **2013**, 32, 483–496.
116. Peruzzi, L.; Gianoglio, B.; Porcellini, G.; Conti, G.; Amore, A.; Coppo, R. Neonatal chronic kidney failure associated with cyclo-oxygenase-2 inhibitors administered during pregnancy. Minerva Urol. Nefrol. **2001**, 53, 113–116.
117. Audemard, C.; Barnaud, A.; Collins, C.M.; Le Roux, F.; Sauriau, P.; Coustau, C.; Blachier, P.; Berthe, F.C. Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: New perspectives. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **2001**, 257, 87–108.

118. Ford, S.E. Dermo Disease of Oysters Caused by *Perkinsus marinus*; Ford, S.E., Ed.; ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish; ICES: Copenhagen, Denmark, **2011**.
119. Mackin, J.G.; Owen, H.M.; Collier, A. Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Science* **1950**, 111, 328–329.
120. Evariste, L.; Auffret, M.; Audonnet, S.; Geffard, A.; David, E.; Brousseau, P.; Fournier, M.; Betoulle, S.: Functional features of hemocyte subpopulations of the invasive mollusk species *Dreissena polymorpha*. *Fish Shellfish Immunol.* **2016**, 56, 144-154.
121. Mitta, G.; Hubert, F.; Dyrzynda, E.A.; Boudry, P.; Roch, P.: Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Dev. Comp. Immunol.* **2000**, 24, 381-393.
122. Mateo, D.R., Spurmanis, A., Siah, A., Araya, M.T., Kulka, M., Berthe, F.C.J., Johnson, G.R. and Greenwood, S.J. Changes induced by two strains of *Vibrio splendidus* in haemocyte subpopulations of *Mya arenaria*, detected by flow cytometry with LysoTracker. *Dis. Aquat. Organ.*, **2009**, 86, 253–262.
123. Allam, B., Ashton-Alcox, K.A. and Ford, S.E. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.*, **2002**, 13, 141–158.
124. García-García, E., Prado-Alvarez, M., Novoa, B., Figueras, A. and Rosales, C. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. *Dev. Comp. Immunol.*, **2008**, 32, 637–653.
125. Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F. and Roch, P. **1999** *J. Cell Sci.* 112, 4233-4242
126. Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzert, M. and Roch, P. **2000** *J. Biol. Chem.* 275, 12954-12962.
127.] Mitta, G., Hubert, F., Noel, T. and Roch, P. **1999** *Eur. J. Biochem.* 265, 71-78.
128. Seo, J.K.; Crawford, J.M.; Stone, L.K.; Noga, E.J.: Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica* **2005**, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998-2004.

129. Hubert, F.; Noel, T.; Roch, P. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Eur. J. Biochem.* 1996, 240, 302–306.
130. Mitta, G.; Vandebulcke, F.; Roch, P.: Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity *FEBS Letters* **2000**, 486, 185-190.
131. Charlet, M.; Chernysh, S.; Philippe, H.; Hetru, C.; Hoffmann, J.A.; Bulet, P. Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 21808–21813.
132. Liao, Z.; Wang, X.C.; Liu, H.H.; Fan, M.H.; Sun, J.J.; Shen, W. Molecular characterization of a novel antimicrobial peptide from *Mytilus coruscus*. *Fish Shellfish Immunol.* **2013**, 34, 610–616.
133. Domeneghetti, S.; Franzoi, M.; Damiano, N.; Norante, R.; El Halfawy, N.M.; Mammi, S.; Marin, O.; Bellanda, M.; Venier, P. Structural and antimicrobial features of peptides related to Myticin C, a special defense molecule from the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 9251–9259.
134. Gerdol, M.; De Moro, G.; Manfrin, C.; Venier, P.; Pallavicini, A. Big defensins and mytimacins, new AMP families of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dev. Comp. Immunol.* **2012**, 36, 390–399.
135. Zhao, J.; Li, C.; Chen, A.; Li, L.; Su, X.; Li, T. Molecular characterization of a novel big defensin from clam *Venerupis philippinarum*. *PLoS ONE* **2010**, 5, e13480.
136. Moreira, R.; Balseiro, P.; Planas, J.V.; Fuste, B.; Beltran, S.; Novoa, B.; Figueras, A. Transcriptomics of in vitro immune-stimulated hemocytes from the Manila Clam *Ruditapes philippinarum* using high-throughput sequencing. *PLoS ONE* **2012**, 7, e35009.
137. Mu, C.; Chen, L.; Zhao, J.; Wang, C. Molecular cloning and expression of a C-type lectin gene from *Venerupis philippinarum*. *Mol. Biol. Rep.* **2014**, 41, 139–144.
138. Cheng-Hua, L.; Jian-Min, Z.; Lin-Sheng, S. Molecular characterization and expression of a novel big defensin (Sb-BDef1) from ark shell, *Scapharca broughtonii*. *Fish Shellfish Immunol.* **2012**, 33, 1167–1173.

139. Arenas, G.; Guzman, F.; Cardenas, C.; Mercado, L.; Marshall, S.H. A novel antifungal peptide designed from the primary structure of a natural antimicrobial peptide purified from *Argopecten purpuratus* hemocytes. *Peptides* **2009**, *30*, 1405–1411.
140. Zhao, J.; Song, L.; Li, C.; Ni, D.; Wu, L.; Zhu, L.; Wang, H.; Xu, W. Molecular cloning, expression of a big defensin gene from bay scallop *Argopecten irradians* and the antimicrobial activity of its recombinant protein. *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 360–368.
141. Seo, J.K.; Crawford, J.M.; Stone, K.L.; Noga, E.J. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 1998–2004.
142. Gueguen, Y.; Herpin, A.; Aumelas, A.; Garnier, J.; Fievet, J.; Escoubas, J.M.; Bulet, P.; Gonzalez, M.; Lelong, C.; Favrel, P.; et al. Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 313–323.
143. Gonzalez, M.; Gueguen, Y.; Desserre, G.; de Lorgeril, J.; Romestand, B.; Bachere, E. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* **2007**, *31*, 332–339.
144. Yeaman, M.R.; Yount, N.Y. Unifying themes in host defense effector polypeptides. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 727–740.
145. Moellering, R.C. (2012) MRSA: the first half century. *J. Antimicrob. Chemother.*, **67**, 4–11.
146. Zhang L, Parente J, Harris SM, Woods DE, Hancock REW, Falla TJ: Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, *49*:2921-2927.
147. Böttger, R., Hoffmann, R. and Knappe, D. (2017) Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum. *PLOS ONE*, **12**, e0178943.
148. Gajski, G., Domijan, A.-M., Žegura, B., Štern, A., Gerić, M., Novak Jovanović, I., Vrhovac, I., Madunić, J., Breljak, D., Filipič, M., et al. Melittin induced cytogenetic damage, oxidative stress and changes in gene expression in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicon*, **2016**, *110*, 56–67.

149. Yamasaki, K. et al Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in *rosacea*. *Nat. Med.* **2007** 13, 975–980.
150. Lai, Y.; Gallo, L.R.: AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple role in immune defense. *Elsevier Ltd.* **2009**, 1471-4906
151. Ong, P.Y. et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* **2002**, 347, 1151–1160.
152. Di Nardo, A. et al. Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization. *J. Immunol.* **2007**, 178, 1829–1834.
153. Marta Guarna, M. et al Anti-inflammatory activity of cationic peptides: application to the treatment of acne vulgaris. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, 257, 1–6.
154. Frohm, M. et al. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 15258–15263.
155. Fahlgren, A. et al. beta-Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis. *Clin. Exp. Immunol.* **2004**, 137, 379–385.
156. Fellermann, K. et al. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am. J. Hum. Genet.* **2006**, 79, 439– 448.
157. Wehkamp, J. et al. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2003**, 9, 215–223.
158. Boman, H.G. Innate immunity and the normal microflora. *Immunol. Rev.* **2000**, 173, 5–16.
159. Islam, D. et al. Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat. Med.* **2001**, 7, 180–185.
160. Lande, R. et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* **2007**, 449, 564–569.

161. Peschel, A. et al. *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J. Exp. Med.* **2001**, 193, 1067–1076.
162. Li, M. et al. The antimicrobial peptide-sensing system aps of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **2007**, 66, 1136–1147.
163. Li, M. et al. Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104, 9469–9474.
164. Gunn, J.S. et al. Genetic and functional analysis of a PmrAPmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect. Immun.* **2000**, 68, 6139–6146.